

# **Charakterisierung von PAM71 in *Arabidopsis thaliana***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von **Iris Steinberger**



19.03.2015

---

Erstgutachter: Prof. Dr. Dario Leister  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Klingl  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2015

---

## Zusammenfassung

Bei Pflanzen und anderen photosynthetisch aktiven Eukaryonten ist der Chloroplast der Ort der Photosynthese. Die Photosynthese besteht aus der, in der Thylakoidmembran stattfindenden Lichtreaktion und der im Stroma ablaufenden Kohlenstofffixierung, der sogenannten Dunkelreaktion. Beim linearen Elektronentransport werden über die in Reihe geschalteten Photosysteme (PSII und PSI) und über den Cytochrom  $b_6/f$  Komplex durch Lichtenergie angeregte Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  übertragen. Die Elektronenlücke im PSII wird durch die Photolyse des Wassers geschlossen. Gleichzeitig trägt die Photolyse zur Generierung des membranständigen Protonengradienten bei, der zur Bildung von ATP genutzt wird.

Im PSII defekte *Arabidopsis thaliana pam71* Mutanten zeigten einen Wachstumsphänotyp und eine Chlorophyll a Fluoreszenz-Kurve, die typisch für im PSII defekte Mutanten ist. Die *pam71* Mutanten näher zu charakterisieren und ihre Funktion zu erforschen stand im Vordergrund dieser Arbeit.

Untersuchungen der „knock-out“ *pam71* Mutanten wiesen weder auf einen Defekt in der Expression von Genen, die für photosynthetische Proteine kodieren, noch auf einen Defekt in der Initiierung der Translation hin. Auch die Neu-Synthese der Untereinheiten des PSII Reaktionszentrums zeigte keine Auffälligkeiten.

PAM71 ist ein in der Thylakoidmembran lokalisiertes Protein mit einem stromalen C-Terminus, sechs Membranspannen, zwei möglichen Kalzium-Bindestellen und einer mutmaßlichen Calmodulin-Bindestelle.

Die *pam71-1* Mutante hatte reduzierte Level der Untereinheiten des PSII Reaktionszentrums und Untereinheiten des Wasserspaltungskomplexes des PSII. Im Vergleich zum Wildtyp besaßen sie weniger PSII Superkomplexe sowie PSI-Monomere, PSII-Dimere und Cytochrom  $b_6/f$ -Dimere.

Spektralanalysen wiesen auf einen Defekt im PSII hin. Ein Defekt im PSI konnte mittels P700 Absorptionsmessungen ausgeschlossen werden.

Die Berücksichtigung aller Ergebnisse dieser Arbeit und der Hinweise aus der Literatur lässt die Vermutung zu, dass PAM71 ein in der Thylakoidmembran lokalisierter Kalzium-Transporter ist.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>10</b>
<b>Einheiten.....</b>	<b>13</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>14</b>
1.1 Photosynthese.....	14
1.1.1 Chloroplasten.....	14
1.1.2 Übersicht über die Photosynthese-Reaktionen.....	16
1.1.3 Die Lichtreaktion.....	16
1.2 Anpassungsmechanismen der Photosynthese.....	19
1.2.1 „State Transitions“.....	20
1.2.2 Längerfristige Anpassungsmechanismen – „Long-term response“ .....	22
1.3 Assemblierung von Photosystem II.....	23
1.4 Transportmechanismen in der Thylakoidmembran.....	24
1.5 Die Rolle von Kalzium in der Zelle.....	27
1.6 Zielsetzung.....	28
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1 Material.....	29
2.1.1 Zentrifugen.....	29
2.1.2 Chemikalien.....	29
2.1.3 Membranen.....	29
2.1.4 Antikörper.....	29
2.1.5 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen.....	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 RNA Extraktion.....	31
2.2.2 RNA Quantifizierung.....	31
2.2.3 Analyse der mit Polysomen assoziierten mRNA.....	31
2.2.4 Northern Blot Analyse.....	33
2.2.5 Herstellung von cDNA.....	34

---

2.2.6 DNA Extraktion.....	35
2.2.7 Standard-PCR.....	35
2.2.8 Agarosegel-Elektrophorese.....	36
2.2.9 Isolation von Gesamtprotein.....	36
2.2.10 Isolation von intakten <i>A. thaliana</i> Chloroplasten zur Proteinanalyse.....	37
2.2.11 Fraktionierung von Chloroplasten.....	38
2.2.12 <i>In vivo</i> Labelling mit <sup>35</sup> S-Methionin.....	38
2.2.13 Saccharose-Gradient: PSII, PSI und LHCII Isolation.....	39
2.2.14 Thylakoidmembran-Isolierung.....	39
2.2.15 Waschen von Thylakoidmembranen mit verschiedenen Salzen.....	40
2.2.16 Thermolysin Behandlung.....	40
2.2.17 Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
2.2.18 Chlorophyllbestimmung für SDS-PAGE.....	41
2.2.19 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
2.2.20 Western Blot.....	42
2.2.21 Immunodetektion.....	43
2.2.22 Chlorophyll a Fluoreszenz-Messung.....	43
2.2.23 P700 Absorptionsmessung.....	44
2.2.24 Gewinnung bioinformatischer Informationen.....	44
2.3 Anhang.....	45
2.3.1 Amplifikationsprimer.....	45
2.3.2 Antikörper.....	46
2.3.3 Accession-Nummern.....	46
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1 Phänotyp der Mutanten.....	48
3.2 Transkription.....	51
3.3 Analyse der mit Polysomen assoziierten mRNA.....	52
3.4 Proteinbiosynthese.....	54
3.5 Lokalisation von PAM71 in der Thylakoidmembran.....	55
3.6 Saccharose-Gradienten-Zentrifugation von Proteinkomplexen.....	56
3.7 Topologie-Studie von PAM71.....	59
3.8 Analyse chloroplastidärer Membranproteinkomplexe mittels Western Blot.....	61
3.9 Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	64

---

3.10 Chlorophyll a Fluoreszenz-Messungen und P700-Absorptionsmessungen...	65
3.11 Protein-Struktur von PAM71.....	72
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1 Ursachen für den Wachstumsphänotyp der <i>pam71</i> Mutanten.....	75
4.2 Die photosynthetische Leistung von PSII ist in <i>pam71</i> Mutanten betroffen.....	76
4.3 PAM71 Proteinsequenz-Homologien.....	79
4.4 Ist Kalziummangel die Ursache für den Phänotyp von <i>pam71</i> Mutanten?.....	82
4.5 Vergleich von <i>pam71</i> Mutanten mit Mutanten mit Defekt im Wasserspaltungskomplex des PSII.....	84
4.6 Ist ein Kalzium-Überschuss für den Phänotyp von <i>pam71</i> Mutanten verantwortlich?.....	85
4.7 Ausblick.....	86
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>6 Lebenslauf.....</b>	<b>101</b>
<b>7 Danksagung.....</b>	<b>102</b>
<b>8 Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>103</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1-1: Der Chloroplast .....	15
Abbildung 1.1.3-1: Elektronentransportkette der Photosynthese .....	18
Abbildung 1.2.1-1: Schema der photosynthetischen Komplexe in der Thylakoidmembran und des „State Transition“ Prozesses .....	22
Abbildung 1.4-1: Photosynthese, Ionen und protonenmotorische Kraft .....	26
Abbildung 3.1-1: Wachstumsphänotyp von 5 Wochen alten WT und <i>pam71</i> Pflanzen und schematische Darstellung der <i>pam71</i> Gensequenz .....	48
Abbildung 3.1-2: PCR-Analyse von <i>pam71-1</i> und <i>pam71-2</i> .....	49
Abbildung 3.1-3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von WT, <i>pam71-1</i> und <i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub> Chloroplasten .....	51
Abbildung 3.2-1: Analyse der Expression von Genen, die für Untereinheiten des PSII kodieren, in WT und <i>pam71-1</i> Pflanzen .....	52
Abbildung 3.3-1: Analyse der mit Polysomen assoziierten mRNA in WT und <i>pam71-1</i> .....	53
Abbildung 3.4-1: <i>In vivo</i> Synthese plastidärcodierter Proteine der Thylakoidmembran .....	55
Abbildung 3.5-1: Lokalisation von PAM71-GFP .....	56
Abbildung 3.6-1: Analyse von LHCII, PSII und PSI mittels Saccharose-Gradient von WT, WT <sub>35S:PAM71-GFP</sub> , <i>pam71-1</i> und <i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub> .....	59
Abbildung 3.7-1: Salzwäsche und Thermolysin-Verdau von intakten Thylakoiden von <i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub> .....	61
Abbildung 3.8-1: Protein-Gehalt von Pflanzen der Linien WT, WT <sub>35S:PAM71-GFP</sub> , <i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub> , <i>pam71-1</i> , <i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71</sub> , <i>pam71-2</i> und <i>pam71-2</i> <sub>35S:PAM71</sub> .....	63
Abbildung 3.8-2: Protein-Gehalt von Pflanzen der Linien WT, <i>pam71-1</i> , <i>pam71-1</i> <sub>135S:PAM71</sub> , <i>pam71-2</i> , <i>pam71-2</i> <sub>35S:PAM71</sub> , <i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub> und WT <sub>35S:PAM71-GFP</sub> .....	64
Abbildung 3.9-1: BN-PAGE von WT, <i>psad1-1</i> , <i>pam71-1</i> und <i>psbo2xpsbo1</i> .....	66
Abbildung 3.10-1: Photosynthese-Leistung der Pflanzenlinien (Imaging-PAM) .....	67

---

Abbildung 3.10-2: Messung der Chlorophyll a Fluoreszenz der Pflanzenlinien (Dual-PAM) .....	70
Abbildung 3.10-3: Darstellung der photosynthetischen Leistung von PSI der 9 Pflanzenlinien .....	72
Abbildung 3.11-1: Darstellung der Proteinstruktur von PAM71 .....	73
Abbildung 3.11-2: Abgleich der Proteinsequenzen von PAM71, TMEM165 und Gdt1p .....	74
Abbildung 3.11-3: Dendrogramm von PAM71 .....	75



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.5-1: Verwendete publizierte T-DNA-Insertionslinien .....	30
Tabelle 2.1.5-2: Verwendete unbeschriebene T-DNA-Insertionslinien .....	30
Tabelle 2.2.7-1: PCR-Programm einer Standard-PCR .....	35
Tabelle 2.2.7-2: PCR-Ansatz für eine Standard-PCR .....	36
Tabelle 2.3.1-1: Amplifikationsprimer für die Genotypisierung von Mutanten .....	45
Tabelle 2.3.1-2: Amplifikationsprimer für Northern Blots .....	45
Tabelle 2.3.2-1: Antikörper .....	46
Tabelle 3.1-1: Chlorophyll-Gehalt der einzelnen Pflanzenlinien .....	50
Tabelle 3.10-1: Mittels Dual-PAM ermittelte $F_v/F_m$ und $\Phi II$ Werte .....	68
Tabelle 3.10-2: $\Delta a/\Delta a_{max}$ und $\Phi I$ Werte der P700-Absorptionskurven .....	72

---

## Abkürzungen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AL	aktinisches Licht
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-Synthase
BN	„Blue native“
bp	Basenpaare
BSA	„Bovine Serum Albumin“, Fraktion V
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
CEF	Zyklischer Elektronentransport
Chl (a/b)	Chlorophyll (a/b)
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glucose
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cyt b <sub>6</sub> /f	Cytochrom b <sub>6</sub> /f Komplex
dd	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F <sub>0</sub>	Grundfluoreszenz
Fd	Ferredoxin
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	maximale Ausbeute des PSII
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -oxidoreduktase
FR	Dunkelrotlicht
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H <sub>2</sub> O	Wasser

---

HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LEF	Linearer Elektronentransport
LHC (I/II)	lichtsammelnder Antennenkomplex (I/II)
LTR	„long-term response“
Mn <sub>4</sub> -Ca-Oxo	Mangan-Kalzium-Oxo-Kluster
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADP <sup>+</sup> /H	Nicotinamin-Adenin-Dinucleotidphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaSCN	Natriumthiocyanat
NDH	NAD(P)H-Dehydrogenase
NPQ	„Non-photochemical Quenching“
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAM	Puls-Amplituden Modulation
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
pLHCII	phosphoryliertes LHCII
pmf	protonenmotorische Kraft
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQ	Plastoquinon

---

PQH <sub>2</sub>	Plastohydrochinol
PS (I/II)	Photosystem (I/II)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q <sub>A</sub> /Q <sub>B</sub>	membranständiges / gebundenes Plastochinon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sr <sup>2+</sup>	Stronzium-Ionen
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T-DNA	transfer DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
Y <sub>z</sub>	Tyrosin-Rest
β-DM	n-Dodecyl-β-maltosid
ΔpH	Protonen-Gradient
ΔΨ	elektrisches Feld
ΦI	Ausbeute des PSI
ΦII	effektive Ausbeute des PSII

---

## Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cpm	„Counts per minute“
Da	Dalton
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunden
Hz	Hertz
k	Kilo
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
sek	Sekunden
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v	Volumen
W	Watt
w	Gewicht
µmol Photonen m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Mikroeinsteinstrom

# 1 Einleitung

## 1.1 Photosynthese

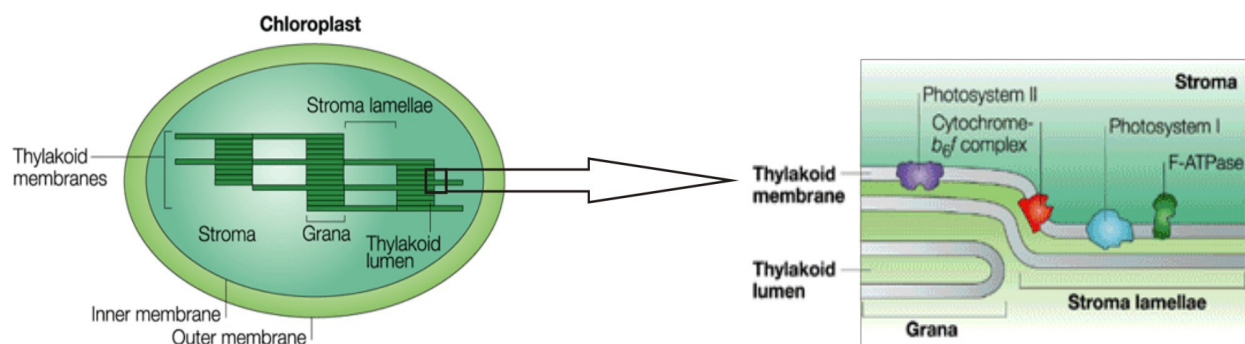
Pflanzen nutzen Lichtenergie für die Fixierung atmosphärischen Kohlenstoffdioxids, aus welchem sie Kohlenhydrate und andere organische Substanzen synthetisieren. Diese photoautotrophe Lebensweise beruht auf der Umwandlung von Sonnenenergie in chemische Energie, der Photosynthese. Photosynthese findet in allen grünen Teilen der Pflanzen, vor allem aber im Blatt statt. Die in den grünen Gewebeteilen enthaltenen Chloroplasten absorbieren die Energie des Lichts über ihr charakteristisches akzessorisches Pigment, dem Chlorophyll.

### 1.1.1 Chloroplasten

Die meisten Chloroplasten (Abb. 1.1.1-1) befinden sich in den Mesophyllzellen des Blattes. Durch die Spaltöffnungen, den Stomata, dringt Kohlenstoffdioxid in das Blatt ein und Sauerstoff kann entweichen. Die typische Mesophyllzelle enthält ca. 30-40 Chloroplasten, die 2-4  $\mu\text{m}$  mal 4-7  $\mu\text{m}$  messen (Campbell, 2003). Diese linsenförmigen Organellen besitzen drei verschiedene Membranen: die innere und äußere Hüllmembran und die Thylakoidmembran. Die doppelte Hüllmembran der Chloroplasten stammt von der endosymbiotischen Aufnahme eines Cyanobakteriums während der evolutionären Entwicklung der Pflanzen (Review-Artikel: Keeling, 2013).

Diese Membranen schließen drei unterschiedliche wässrige Räume ein: den Intermembranraum, das Stroma und das Thylakoid-Lumen. Im Stroma finden die Kohlenstofffixierung, Aminosäuresynthese und verschiedene andere Stoffwechselvorgänge statt. Die Thylakoidmembran ist der Ort der Lichtaufnahme und der ATP-Synthese. Das Charakteristikum der Thylakoidmembran ist, dass sie in zwei funktionell unterschiedliche Bereiche aufgeteilt ist. Einer dieser Bereiche ist durch die Grana gekennzeichnet, welche aus zylindrischen Stapeln von 5 bis 20 Lagen Thylakoidmembran bestehen. Die tatsächliche Feinstruktur dieser Grana kann sowohl von Pflanzenart zu Pflanzenart variieren als auch von den Lichtbedingungen abhängen. Jedes Granum wird von zwei zum Stroma ausgerichteten Thylakoidmembranen, den Stromalamellen, eingebettet, welche auf diese Weise zwei angrenzende Grana-Stapel miteinander verbinden. Die Stromalamellen stellen damit den zweiten funktionellen

Bereich des Thylakoidmembran-Systems dar. In jedem Chloroplasten wird mit dieser Art der Organisation von Thylakoidmembranen ein durchgängiges Netzwerk effizient gestapelter Membranen geschaffen, die nur einen einzigen inneren Raum als Lumen zulassen (Shimoni et al., 2005). In der Thylakoidmembran sind verschiedenste Proteinkomplexe verankert. Unter anderem handelt es sich dabei um die zur photosynthetischen Ladungstrennung notwendigen Photosysteme I und II sowie die ATP-Synthase und dem Cytochrom  $b_6/f$  Komplex. Die Thylakoidmembran besitzt eine laterale Heterogenität (Andersson und Andersson, 1980). So ist das Photosystem II (PSII) hauptsächlich in den Grana-Stapeln lokalisiert, während sich das Photosystem I (PSI) und die ATP-Synthase in den Stromalamellen befinden. Der Cytochrom  $b_6/f$  Komplex ist gleichmäßig auf beide Bereiche der Thylakoidmembran aufgeteilt. Die Heterogenität ergibt sich aus der Struktur von PSI und der ATP-Synthase. Beide Proteinkomplexe besitzen große, in das Stroma reichende Domänen. Da diese in den eng aufgeschichteten Membran-Schichten der Grana-Stapel, die einen Abstand von 3 bis 4 nm voneinander aufweisen, keinen Platz finden würden, sind sie in den Stromalamellen lokalisiert (Daum et al., 2010; Kirchhoff et al., 2011).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

### Abbildung 1.1.1-1: Der Chloroplast

Chloroplasten sind Organellen, die eine doppelte Hüllmembran besitzen und in grünen Pflanzen und Algen vorkommen. Sie enthalten die Thylakoidmembran, den Ort der Photosynthese. In der Thylakoidmembran sind Proteinkomplexe wie Photosystem I und II, Cytochrom  $b_6/f$  Komplex und die ATP-Synthase lokalisiert. Die Thylakoidmembran faltet sich in Grana-Stapel, die das Photosystem II und den Cytochrom  $b_6/f$  Komplex enthalten, und Stromalamellen, die Photosystem I, die ATP-Synthase und den Cytochrom  $b_6/f$  Komplex beherbergen. Das Stroma umgibt die Thylakoidmembran, während der Innenraum der Thylakoidmembran das Lumen darstellt (Nelson und Ben-Shem, 2004). (Lizenznummer der Original-Abbildungen: 3547540888390)

### 1.1.2 Übersicht über die Photosynthese-Reaktionen

Die Photosynthese läuft in zwei funktional und räumlich getrennten Reaktionen ab.

Als Lichtreaktion bezeichnet man die Spaltung von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ); dabei entstehen als „Abfallprodukt“ Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und als wichtige Energieträger die Verbindungen Adenosintriphosphat (ATP) und das als Reduktionsäquivalent bezeichnete Nicotinamin-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH) (Whatley et al., 1963). Die Dunkelreaktion, auch Calvin-Zyklus genannt, läuft im Stroma des Chloroplasten ab und beschreibt die Kohlenstofffixierung aus Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) in Zuckermoleküle ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ).

Die zusammenfassende Reaktionsgleichung der Photosynthese lautet:



### 1.1.3 Die Lichtreaktion

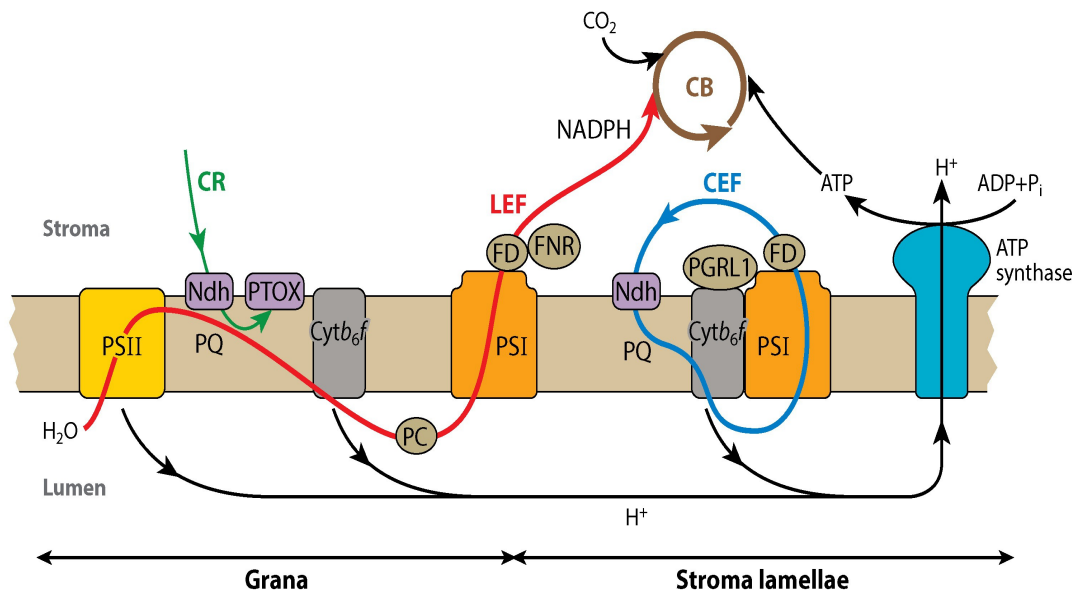
Bei der Lichtreaktion (Abb. 1.1.3-1) sind zwei Wege des Elektronentransportes möglich, der lineare und der zyklische Elektronentransport. Der lineare Elektronentransport (LEF) dient der Gewinnung von Elektronen und Photonen aus Wasser sowie der Synthese von ATP und NADPH. Der zyklische Elektronentransport (CEF) zeichnet sich durch eine gesteigerte ATP Produktion durch die Wiedereinspeisung von Elektronen in die Transportkette aus. Es wird zwischen dem Antimycin-A-nicht-sensitiven zyklischen Elektronentransport und dem Antimycin-A-sensitiven zyklischen Elektronentransport unterschieden (Review-Artikel: Blunder et al., 2012).


Beim linearen Elektronentransport sind PSII und PSI beteiligt. Die eingestrahlten Photonen werden vom lichtsammelnden Antennenkomplex (LHC) des PSII (LHCII) absorbiert. Ein absorbiertes Photon regt ein Elektron um den Betrag der Photonenenergie im Chl a-Dimer („special pair“) an und erzeugt dort eine Elektronenlücke (Norris et al., 1974). Damit ist das Chl a-Dimer oxidiert. Im Reaktionszentrum des PSII, P680, wird dieses angeregte freie Elektron vom primären Elektronenakzeptor Pheophytin a aufgenommen. Pro Anregungsvorgang werden je zwei Elektronen auf den primären Elektronenakzeptor transferiert (Review-Artikel: Nelson und Ben-Shem, 2004).



Der Wasserspaltungskomplex von PSII entzieht zwei Wassermolekülen insgesamt vier Elektronen und überträgt diese nacheinander auf das oxidierte P680, wodurch die entstandenen Elektronenlücken ausgeglichen werden. Bei dieser lichtinduzierten Wasserspaltung, auch Photolyse genannt, werden zudem Protonen und Sauerstoff freigesetzt (Hoganson und Babcock, 1997; Junge et al., 2002; Review-Artikel: Vrettos et al., 2001).

Pheophytin a überträgt das Elektron auf ein membranständiges Plastochinon ( $Q_A$ ), das wiederum das Elektron auf ein reversibel an PSII gebundenes Plastochinon ( $Q_B$ ) weitergibt. Durch die Aufnahme von zwei Protonen aus dem Stroma wird das  $Q_B$  zu einem mobilen Elektronenüberträger (Review-Artikel: Nelson und Ben-Shem, 2004) und kann das Elektron auf den Cytochrom  $b_6/f$  Komplex (Cyt  $b_6/f$ ) überführen (Hurt und Hauska, 1981). Plastocyanin (PC), ebenfalls ein mobiler Elektronenüberträger, speist das Elektron anschließend in das PSI ein. Die vom PSII stammenden Elektronen füllen die analog zum PSII entstandene Elektronenlücke vom Reaktionszentrum des PSI, P700. Die folgende Elektronentransportkette führt vom Ferredoxin (Fd) zur Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktase (FNR), welche die Elektronen vom Fd auf NADP<sup>+</sup> überträgt. Durch diese Redoxreaktion wird die Reduktionskraft der Elektronen im NADPH gespeichert (Campbell, 2003; Morales et al., 2000).



 Rochaix J-D. 2014.  
Annu. Rev. Plant Biol. 65:287–309

### Abbildung 1.1.3-1: Elektronentransportkette der Photosynthese

Dargestellt ist die Thylakoidmembran mit PSII, Cytochrom  $b_6/f$  Komplex (Cyt  $b_6/f$ ), PSI und der ATP-Synthase. Der lineare Elektronentransport (LEF) ist als rote Linie, der zyklische Elektronentransport (CEF) als blaue Linie hervorgehoben; die Pfeile geben die Richtung an, in der die Reaktionen ablaufen. Der LEF beginnt mit der photoinduzierten Oxidation des Wassers, das durch das PSII katalysiert wird. Elektronen werden vom PSII auf das Plastochinon (PQ) und vom PQ zum als Protonenpumpe agierenden Cyt  $b_6/f$  transferiert. Vom Cyt  $b_6/f$  werden die Elektronen zum Plastocyanin (PC) und von dort zum PSI überführt. Die folgende Elektronentransportkette führt vom Ferredoxin (FD) zur Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktase (FNR), welche die Elektronen vom FD auf NADP<sup>+</sup> überträgt und somit NADPH bildet. Der CEF führt vom PSI zurück zum Cyt  $b_6/f$  und findet vor allem in den Stromalamellen der Thylakoide statt. Beim LEF und CEF werden Protonen ins Lumen gepumpt. Der entstandene Protonengradient wird von der ATP-Synthase genutzt, um ATP herzustellen. ATP und NADPH wird im Calvin-Zyklus (CB, brauner Pfeil) benötigt, um CO<sub>2</sub> aufzunehmen. Die Chlororespirationskette ist als grüner Pfeil dargestellt. PTOX: plastidäre terminale Oxidase. (Rochaix, 2014). (keine Lizenznummer notwendig)

Die durch die Lichtreaktion erzeugte protonenmotorische Kraft generiert einen pH-Gradienten über die Thylakoidmembran, welcher seinerseits von der ATP-Synthase der Chloroplasten genutzt wird, um energiereiches ATP herzustellen. Dieses Enzym wird auch CF<sub>1</sub>-CF<sub>0</sub>-Komplex (C=Chloroplast; F=Faktor) genannt. Während die CF<sub>0</sub>-Einheit die Protonen durch die Thylakoidmembran leitet, katalysiert die CF<sub>1</sub>-Einheit die Bildung von ATP aus ADP und P<sub>i</sub>. Das neu synthetisierte ATP, das ähnlich wie NADPH direkt in das Stroma abgegeben wird, steht anschließend für die nachfolgende Dunkelreaktion,

dem Calvin-Zyklus, zur Verfügung, bei welchem CO<sub>2</sub> in Kohlenhydrate umgewandelt wird (Review-Artikel: von Ballmoos et al., 2009).

Am zyklischen Elektronentransport ist von den Photosystemen dagegen nur PSI beteiligt. In diesem Prozess werden die Elektronen vom Fd über Cyt b<sub>6</sub>/f und PC wieder zurück zum Reaktionszentrum vom PSI, P700, geleitet. Es werden dabei weder NADPH noch Sauerstoff, sondern nur ATP gebildet. Während im linearen Elektronentransport ähnliche Mengen an ATP und NADPH entstehen, benötigt der Calvin-Zyklus in C<sub>3</sub> Pflanzen diese im Verhältnis 3:2 (Review-Artikel: Joliot und Joliot, 2006); in C<sub>4</sub> Pflanzen wird ein Verhältnis von 5:2 benötigt (Takabayashi et al., 2005). Da im linearen Prozess die ATP-Produktion durch den pH-Gradienten limitiert wird, kann dieses ATP-Defizit durch den zyklischen Prozess ausgeglichen werden (Eberhard et al., 2008).

Auf Grund der Tatsache, dass die Substanz Antimycin A den zyklischen Elektronentransport lediglich teilweise blockieren kann (Review-Artikel: Moss und Bendall, 1984), wird zwischen zwei Formen des CEF unterschieden: dem Antimycin-A-sensitiven CEF, der die Proteine PGR5 und PGRL1 benötigt (Munekage et al., 2002; DalCorso et al., 2008; Hertle et al., 2013), und dem Antimycin-A-nicht-sensitiven CEF, in welchem der Elektronenfluss über den NDH Komplex realisiert wird (Tagawa et al., 1963).

## **1.2 Anpassungsmechanismen der Photosynthese**

Bedingt durch ihre ortsgebundene Lebensweise müssen Pflanzen mit wechselnden biotischen und abiotischen Einflüssen ihres Lebensraumes zurecht kommen (Walters, 2005). Sie können sich an unterschiedlichste Umweltbedingungen wie z.B. an Sonneneinstrahlung, Temperatur, Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen, atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Gehalt oder Krankheitserreger anpassen (Review-Artikel: Anderson et al., 1995).

Änderungen der Lichtintensität und -qualität entstehen durch den nach Jahres- und Tageszeit variierenden Sonnenstand, das Vorhandensein von Wolken und die durch Wind gedrehten Blätter.

Pflanzen wirken variierenden Lichtbedingungen entgegen, indem sie Anpassungsmechanismen entwickelten. Im folgenden werden zwei Mechanismen näher betrachtet, die unter sich ändernden Lichtbedingungen für eine effiziente Photosynthese-Leistung sorgen. Dabei handelt es sich zum einen um die „State Transitions“, die kurzzeitige Lichtschwankungen ausgleichen, und zum anderen um die Langzeitanpassungsreaktion „long-term response“ (LTR), die es der Pflanze ermöglicht, die Stöchiometrie der Photosysteme an die veränderten Lichtbedingungen anzupassen (Review-Artikel: Pfannschmidt et al., 2008).

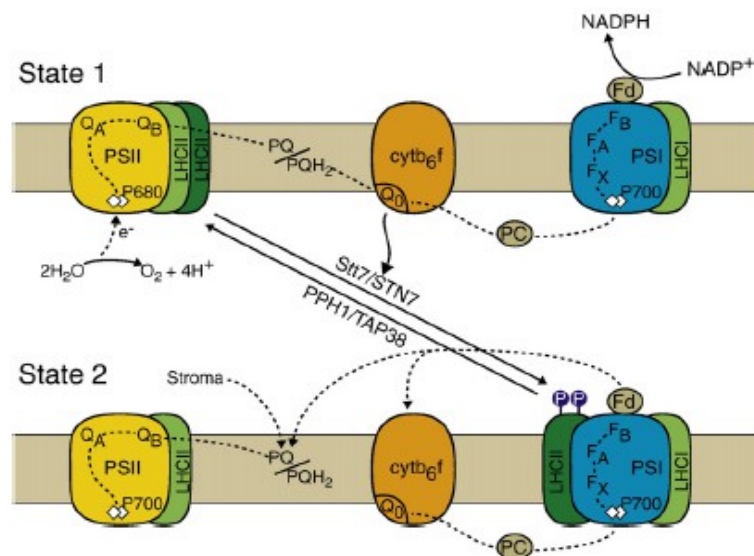
### 1.2.1 „State Transitions“

Die Fähigkeit photosynthetisch aktiver Organismen, schnell auf sich ändernde Lichtbedingungen, z.B. Lichtintensität oder Lichtqualität, zu reagieren, wird „State Transitions“ (Abb. 1.2.1-1) genannt (Review-Artikel: Allen, 1992; Wollman, 2001). Dabei ändern diese Organismen die relative Größe ihrer PSI und PSII Antennen.

Lichtbedingungen, die vorzugsweise PSII anregen (z.B. Schwachlicht), generieren einen stark reduzierten PQ-Pool. Die Reduktion des PQ-Pools führt zu einer verstärkten Anbindung des Plastoquinons ( $\text{PQH}_2$ ) an die  $\text{Q}_\text{O}$ -Seite des Cyt  $\text{b}_6/\text{f}$ , was wiederum zur Aktivierung einer Thylakoid-Protein-Kinase führt. Diese Kinase ist in der Lage, LHCII zu phosphorylieren (Vener et al., 1997; Zito et al., 1999). Die durch die Phosphorylierung ausgelösten Konformationsänderungen des LHCII bewirken die Assoziation von LHCII mit PSI in den Stromalamellen (Nilsson et al., 1997). Das führt dazu, dass zusätzliche Anregungsenergie zum PSI geleitet wird. Auf diese Weise wird die Anregungsenergie, hervorgerufen durch einfallendes Licht, zwischen den beiden Photosystemen ausgeglichen (Allen und Forsberg, 2001; Haldrup et al., 2001; Wollman, 2001; Rochaix, 2007; Eberhard et al., 2008). Der Zustand, in dem der überwiegende Teil der mobilen Fraktion des LHCII an das PSI gebunden ist, wird „State 2“ genannt. Das Andocken des phosphorylierten LHCII (pLHCII) an PSI benötigt dazu die Untereinheiten H, L und O von PSI. Dies wurde durch die Unterbindung des Vorgangs bei entsprechenden *A. thaliana* Mutanten gezeigt (Lunde et al., 2000; Jensen et al., 2004). Der PQ-Pool wird verstärkt oxidiert, wenn einfallendes Licht bevorzugt PSI anregt. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung der LHCII-Kinase. Die Phosphatase, TAP38 (Pribil et al., 2010), katalysiert die Dephosphorylierung von an PSI gebundenen pLHCII und damit die

Rückkehr der mobilen Fraktion von LHCII zum PSII. Dieser Zustand wird als „State 1“ bezeichnet (Review-Artikel: Allen, 1992; Wollman, 2001).

Um die Identität der LHCII-Kinase aufzuklären, wurden nach *Chlamydomonas reinhardtii* Mutanten gesucht, die nicht mehr in der Lage waren, „State Transitions“ auszuführen (Fleischmann et al., 1999). Es konnte eine Mutante identifiziert werden, die einen Defekt in einer Serine-Threonin-Protein-Kinase (Stt7) aufwies (Depege et al., 2003). Die *stt7* Mutante zeigte einen Block in „State 1“ und konnte unter Lichtbedingungen, die „State 2“ begünstigen, LHCII nicht phosphorylieren. Stt7 findet seine homologe Entsprechung im *A. thaliana* Genom in *STN7*. Die *stn7* Mutante war nachweislich in der LHCII Phosphorylierung und der Umverteilung von LHCII zu PSI zu Lasten von PSII gestört (Bellafigliore et al., 2005; Bonardi et al., 2005).



**Abbildung 1.2.1-1:** Schema der photosynthetischen Komplexe in der Thylakoidmembran und des „State Transition“ Prozesses

„State Transitions“ werden maßgeblich durch den Redox-Zustand des PQ Pools bestimmt. Die bevorzugte Anregung von PSI führt zur Oxidation des PQ Pools und zu „State 1“. In „State 1“ ist der mobile Teil des lichtsammelnden Antennenkomplexes (LHCII) überwiegend an PSII gebunden. Eine verstärkte Anregung des PSII relativ zu PSI führt zu einem reduzierten Zustand des Plastoquinon Pools und demzufolge zum Andocken des Plastoquinons an die Q<sub>o</sub> Seite des Cytochrom b<sub>6</sub>/f Komplexes. Das aktiviert die LHCII Kinase und führt zur Verlagerung des phosphorylierten LHCII vom PSII zum PSI (State 2). Elektronentransportketten sind als gepunktete Linie dargestellt. P680: PSII Reaktionszentrum Chlorophyll a-Dimer; Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>: Primärer und sekundärer Elektronenakzeptor von PSII; P700: PSI Reaktionszentrum Chlorophyll a-Dimer; F<sub>x</sub>, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub>, 4Fe–4S Zentren wirken wie Elektronenakzeptoren im Inneren des PSI; PQ: Plastoquinon Pool; PC: Plastocyanin; Fd: Ferredoxin (Rochaix, 2011). (Lizenznummer: 3546420270239)

### 1.2.2 Längerfristige Anpassungsmechanismen – „Long-term response“

Lichtbedingungen, die wegen spektraler Verschiebung oder Intensitätsänderungen über einen längeren Zeitraum vorzugsweise PSI oder PSII anregen, lassen die Photosynthese-Leistung in der Regel sinken. Um eine maximale Quantenausbeute zu gewährleisten, passt die Pflanze die Stöchiometrie der Photosysteme den neuen Lichtbedingungen an. Dies zieht Veränderungen in der Anzahl der Reaktionszentren und Lichtsammelproteine nach sich. Dieser Prozess verläuft über Stunden bis Tage und wird als „long-term response“ bezeichnet (Review-Artikel: Melis, 1991; Fujita, 1997).

Ähnlich wie bei „State Transitions“ ist die Regulation der LTR vom Redoxstatus des PQ-Pools abhängig. Während der Mechanismus der „State Transitions“ ausschließlich auf post-translationalen Modifikationen beruht, basiert die Anpassung der Photosystem-Stöchiometrie auf einer veränderten Expression der entsprechenden plastidär- und kernkodierten Proteine und auf einer veränderten Akkumulation von Chl a und Chl b (Pfannschmidt et al., 2001). Sowohl bei *A. thaliana* als auch bei den meisten anderen untersuchten Arten, z.B. *Chlamydomonas reinhardtii*, wird die LTR überwiegend durch eine Anpassung der Anzahl an PSI-Komplexen bewerkstelligt (Fey et al., 2005; Dietzel et al., 2008). Nach der Belichtung mit PSI Licht bewirkt die veränderte PSI-Protein-Expression eine ausführliche Restrukturierung der Thylakoidmembran einschließlich der Ausbildung von Grana-Stapeln und der reduzierten Akkumulation transitorischer Stärke in Plastiden (Dietzel et al., 2008). Vorerst wurde angenommen, dass STN7 in diesem Prozess eine Rolle spielt, da die *stn7* Mutante von *A. thaliana* einen Defekt zeigte, der sich sowohl hinsichtlich der „State Transitions“ als auch hinsichtlich der LTR auswirkte (Bonardi et al., 2005; Tikkanen et al., 2006). Allerdings wurde 2009 von Pesaresi et al. gezeigt, dass „State Transitions“ nicht für die LTR erforderlich sind.

### 1.3 Assemblierung von Photosystem II

Das Photosystem II ist ein Multi-Proteinkomplex, der als lichtgetriebene Wasser-Plastochinon-Oxidoreduktase fungiert. PSII ist in der Thylakoidmembran der Chloroplasten angesiedelt und besteht aus mehr als 20 Untereinheiten (Review-Artikel: Wollman et al., 1999; Iwata und Barber, 2004; Nelson und Yocum, 2006; Nanba und Satoh, 1987).

Die Assemblierung des PSII beginnt mit der Bildung des PSII-Reaktionszentrums. Es besteht aus den Untereinheiten D1 und D2, welche Chlorophyll, Phaeophytin und Plastochinon binden, sowie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des Cytochrom  $b_{559}$  (Nanba und Satoh, 1987) (auch PsbE und PsbF genannt) und der 4 kDa großen Untereinheit PsbI (Wijk et al., 1997; Müller und Eichacker, 1999; Zhang et al., 1999; Rokka et al., 2005). In einem nächsten Schritt wird das lichtsammelnde, Chl a bindende Protein CP47 in das Reaktionszentrum von PSII eingefügt, es folgen PsbH und drei weitere niedermolekulare Untereinheiten. Das so entstandene Molekül stellt das CP43-freie

PSII Monomer dar. Die Untereinheit CP43, ebenfalls ein lichtsammelndes, Chl a bindendes Protein, wird unabhängig synthetisiert und anschließend begleitend mit der Untereinheit PsbK in das PSII Monomer eingebaut. Dieser Schritt scheint essentiell für die darauffolgende Dimerisierung von PSII Monomeren zu sein. Des weiteren ist die Eingliederung von CP43 in das PSII Monomer die Voraussetzung für eine stabile Vereinigung des PSII Monomers mit der extrinsischen Untereinheit PsbO (Rokka et al., 2005). PsbO bildet zusammen mit den Untereinheiten PsbP, PsbQ (Ghanotakis et al., 1984b) und PsbR den Wasserspaltungskomplex des PSII (Ljungberg et al., 1984). Der Wasserspaltungskomplex besteht in seinem Zentrum aus einem tetranukleären Mangan-Kalzium-Oxo-Kluster ( $Mn_4\text{-Ca-Oxo}$ ), der von den Untereinheiten PsbO, PsbP, PsbQ und PsbR stabilisiert wird (Ghanotakis et al., 1984b; Ljungberg et al., 1984). Abschließend werden durch die Anlagerung von LHCII Trimeren an die PSII Dimere PSII Superkomplexe gebildet (Boekema et al., 1995). Wahrscheinlich fungieren Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb6 als Verbindungsstücke zwischen den PSII Dimeren (Review-Artikel: Nelson und Yocum, 2006).

## **1.4 Transportmechanismen in der Thylakoidmembran**

In allen lebenden Organismen spielen Ionen eine wichtige Rolle, da sie in Stoffwechselvorgängen und auf zellulärer Ebene involviert sind. Ionen befinden sich in allen subzellulären Kompartimenten und müssen daher von der extrazellulären Matrix zu ihrem Zielort in der Zelle transportiert werden. Bei der Akquisition und Translokation von Ionen in Pflanzenorganen, Zellen und subzellulären Kompartimenten sind in *A. thaliana* Ionen-Transporter-Komplexe beteiligt, welche aus einer Vielzahl von Protein-Familien zusammengesetzt sind. Diese Transporter weisen unterschiedliche Substrat-Spezifitäten, Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisation auf. Die Ionen-Transporter Protein-Familien können in drei Hauptkategorien klassifiziert werden: Kanäle/Porine, primäre Transporter/Pumpen und sekundäre Transporter (Saier et al., 2009).

Kanäle transportieren gelöste Stoffe mit Hilfe eines Konzentrationsgradienten ohne Verwendung von Energie und sind somit die effizientesten und schnellsten Transporter. Primäre Transporter (zum Beispiel die ATP-Synthase) transportieren Moleküle mittels

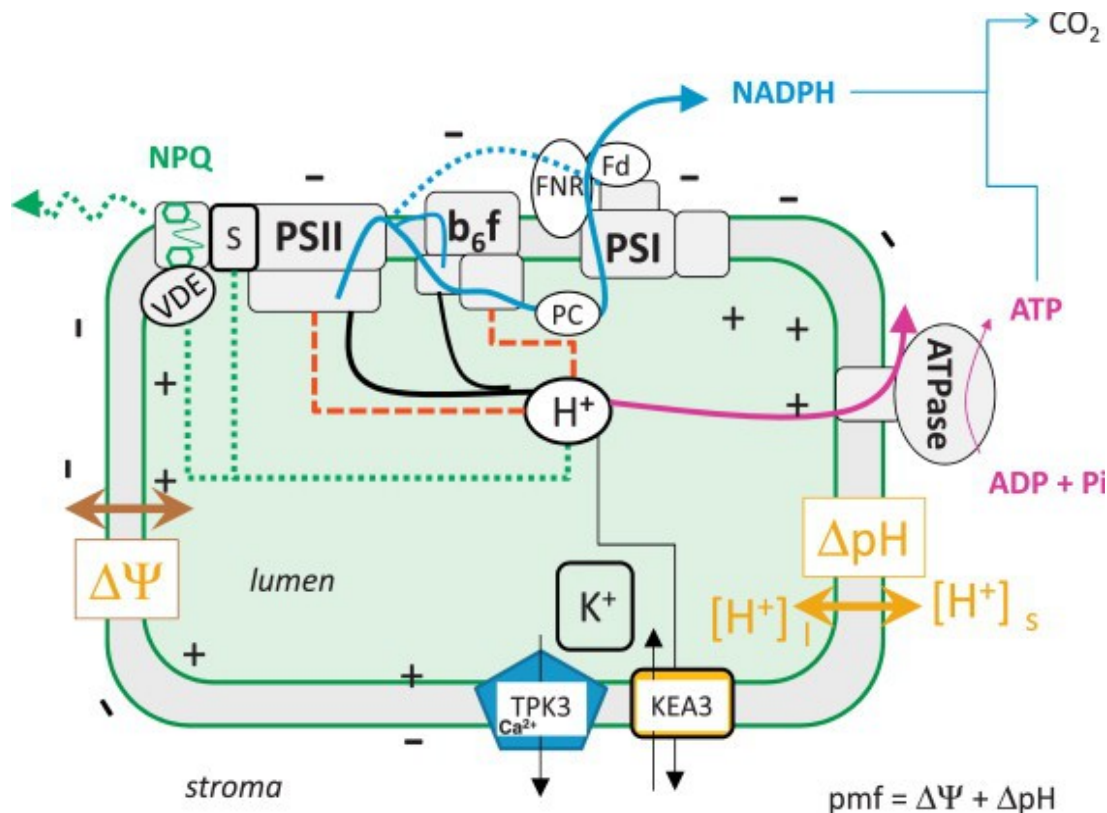


Energieaufwendung durch Membranen. Sekundäre Transporter, auch elektro-chemisch-getriebene Transporter genannt, nutzen den Konzentrationsgradienten von co-transportierten Molekülen, weshalb Antiporter und Symporter zu dieser Gruppe zählen. Im Chloroplasten befindet sich eine große Vielfalt an Ionen, die in Konzentrationen zwischen Mikromol und Millimol vorliegen. Da Metalle wie Zink, Kupfer und Eisen für eine Zelle toxisch sein können, liegen sie normalerweise nicht als freie Ionen vor. Sie sind immer an Proteine oder andere Biomoleküle gebunden. Im umgekehrten Falle sind Ionen wie Kalium oder Magnesium frei vorhanden und können Konzentrationen bis zum millimolaren Bereich erreichen. In den letzten 40 Jahren wurde das Wissen über den Ionenfluss durch die Hüllmembranen der Chloroplasten oder durch die Thylakoidmembran vor allem von physiologischen Messungen oder den Erkenntnissen über den Stoffwechsel der Chloroplasten abgeleitet. Viele der Proteine, die für diesen Ionenfluss verantwortlich sind, sind noch nicht identifiziert. Ihre Identifikation wird vor allem durch ihr geringes Auftreten, ihrer Lokalisation in Intrazellulärmembranen, ihrer Wasserunlöslichkeit und die Schwierigkeiten, sie in heterologen Systemen zu produzieren, erschwert (Review-Artikel: Finazzi et al., 2014).

Erst kürzlich wurde der TPK3 („two-pore potassium ( $K^+$ ) channel“) entdeckt, ein in den Stromalamellen lokalisierter Kalium-Kanal (Abb. 1.4-1). TPK3 reguliert aktiv die beiden Komponenten der protonenmotorischen Kraft (pmf) durch das Ausbalancieren von Ionen (Carraretto et al., 2013). Die pmf entsteht durch das mittels Elektronenfluss aufgebaute elektrische Feld ( $\Delta\Psi$ ) und durch den Gradienten in der Protonenkonzentration ( $\Delta pH$ ) (Finazzi und Rappaport, 1998). *tpk3* Mutanten zeigen reduziertes Wachstum und eine veränderte Organisation der Thylakoidmembran. Dieser Phänotyp bestätigt das empirische Resultat, dass die Fähigkeit, eine normale pmf aufzubauen, gestört ist. Das führt zu einer reduzierten  $CO_2$ -Fixierung und einem Defizit der Wärmeabstrahlung der PSII Antennen-Komplexen zum Ausgleich eines Elektronenüberschusses (NPQ) (Carraretto et al., 2013). Um den  $K^+$ -Gradienten wieder abbauen zu können, z.B. während inaktiver Photosynthese, braucht es einen Gegenspieler zu TPK3.

Hierfür ist KEA3 („ $K^+/H^+$  exchanger“) ein geeigneter Kandidat. Tatsächlich zeigt die dramatische pmf über die Thylakoidmembran, die einem pH-Wert von 2,5 entspricht (Finazzi und Rappaport, 1998), dass ein  $K^+/H^+$ -Antiporter die  $K^+$ -Aufnahme ins Thylakoid-Lumen antreibt. Auf diese Theorie bezogen wurde kürzlich KEA3 die Rolle

zugeschrieben, die pmf im Licht zu regulieren. *A. thaliana* Mutanten, die kein KEA3 besitzen, zeigten eine veränderte pmf unter Belichtung (Kunz et al., 2014; Armbruster et al., 2014). Interessanterweise war  $\Delta\Psi$  in der *tpk3* Mutante verdoppelt (Carraretto et al., 2013), während es in der *kea3* Mutante um 20% verringert war (Kunz et al., 2014).



**Abbildung 1.4-1:** Photosynthese, Ionen und protonenmotorische Kraft

Der Elektronentransport entlang der Photosysteme in der Thylakoidmembran (blaue Linie) führt zur Herstellung von NADPH, zur Erzeugung eines elektrischen Feldes ( $\Delta\Psi$ ) und eines Protonen-Gradienten ( $\Delta pH$ ). Dies führt zur Entstehung der protonenmotorischen Kraft (pmf), die von der ATP-Synthase zur Herstellung von ATP und letztendlich zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung genutzt wird. Der Protonen-Gradient reguliert den Elektronenfluss (rote Linie) und die Wärmeabstrahlung in den PSII Antennen-Komplexen (NPQ, grüne Linie). TPK3 („two-pore potassium channel“) und KEA3 („ $\text{K}^+/\text{H}^+$  exchanger“) sind in der Thylakoidmembran lokalisiert und helfen bei der Regulation und Aufrechterhaltung der pmf (Finazzi et al., 2014). (Lizenznummer: 3544881332026)

Als dritter Ionen-Transporter in der Thylakoidmembran wurde der Kupfer-Transporter PAA2 / HMA8 („P-type ATPase of *Arabidopsis* / Heavy-metal-associated 8“) identifiziert. In Zusammenarbeit von PAA2 mit PAA1 / HMA6, einem in der inneren Hüllmembran

des Chloroplasten lokalisierten Kupfer-Transporters, wird Plastocyanin das benötigte Kupfer bereit gestellt (Tapken et al., 2012).

## 1.5 Die Rolle von Kalzium in der Zelle

Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) repräsentiert wahrscheinlich das am vielseitigsten einsetzbare Ion in eukaryontischen Organismen. Es ist in nahezu alle Vorgänge der pflanzlichen Entwicklung involviert und an vielen regulierenden Prozessen beteiligt. Kalzium kann sehr einfach Komplexe mit Proteinen, Membranen und organischen Säuren bilden. Auf der einen Seite macht diese Eigenschaft Kalzium in höheren Konzentrationen zu einem toxischen zellulären Bestandteil, da es auf Grund seiner chemischen Eigenschaften unlösliche Komplexe mit Phosphat bildet. Auf der anderen Seite ebnete möglicherweise die strenge räumliche und temporäre Kontrolle von zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen den Weg für das evolutionäre Entstehen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegen (Review-Artikel: Kudla et al., 2010).

Eukaryontische Zellen transportieren aktiv  $\text{Ca}^{2+}$  vom Zytosol zu Organellen und extrazellulären Kompartimenten, um eine geringe Anzahl an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Zytosol (ca. 100nM) beizubehalten. Apoplastische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (mehr als 1mM) sind für gewöhnlich sehr viel höher als zytoplasmatische Konzentrationen. Die daraus resultierende 10.000-fach höhere Differenz zwischen zytoplasmatischen und apoplastischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ermöglicht die Erzeugung von Kalzium-Signalen durch schnelle Änderungen des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels in eukaryontischen Zellen. Die Änderungen des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels werden von Kalzium-Sensor-Proteinen erkannt, die in Folge dessen Signal-Transduktionsstoffwechselwege aktivieren. Eine weit verbreitete Kalzium-bindende Proteindomäne ist die sogenannte „EF-Hand“. Sie stellt einen „Helix-Loop-Helix“ Bereich in Proteinen dar. Die Bindung von Kalzium führt zu einer Konformationsänderung des betreffenden Proteins. In *A. thaliana* werden mindestens 250 „EF-Hand“-Motive kodiert. Das „EF-Hand“-Motiv ist Bestandteil von wichtigen Kalzium-Sensor-Proteinen wie Calmodulin (CaM), Calmodulin-ähnliche Proteine (CML) und Kalzium-abhängige Protein-Kinasen (CDPK) (Review-Artikel: Batistič und Kudla, 2012).

## 1.6 Zielsetzung

Obwohl der Mechanismus der Photosynthese und der zugehörigen Proteinkomplexe bereits erforscht ist, sind weder alle Assemblierungsfaktoren zum Aufbau und zur Synthese des PSII und PSI bekannt noch sind sämtliche Membranproteine, die in der Photosynthese eine Rolle spielen, entdeckt.

Um ein besseres Verständnis von Membranproteinen, die ihren Beitrag zur Photosynthese leisten, zu erlangen, wurde ehemals nach Mutanten mit einem Wachstumsphänotyp gesucht. Dabei wurden Mutanten überprüft, bei denen die Mutation in einem Membranprotein mit plastidärer Lokalisation lag. Zu Beginn dieser Arbeit lag eine *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Mutante vor, die eine Störung im PSII aufwies und ein vermindertes Wachstum zeigte. Diese Mutante trägt eine T-DNA-Insertion im Gen *At1g64150* und wurde *pam71* genannt. Dabei wird zwischen der *pam71-1* und *pam71-2* Mutante unterschieden. Diese beiden Mutanten tragen die T-DNA-Insertion an jeweils unterschiedlicher Stelle im *At1g64150*-Gen.

Unter Verwendung einer Vielzahl molekularbiologischer und (Protein-) biochemischer Methoden sollte herausgefunden werden, woher der Defekt im PSII der *pam71* Mutanten stammt. Hierbei wurden sowohl die Expression der Gene, die Neu-Synthese von Proteinen, die Proteinlevel als auch die Protein-Superkomplex-Zusammensetzung untersucht. Von Interesse war auch die Lokalisation des PAM71 Proteins und dessen Topologie in der Thylakoidmembran.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zentrifugen**

Abhängig vom Volumen der zu trennenden Lösung und der Größe des Reaktionsgefäßes kamen die Zentrifugen Beckman Avanti J-25, Eppendorf Zentrifuge 5415 R bzw. 5415 D und VWR Ministar Silverline mit den passenden Rotoren zum Einsatz.

#### **2.1.2 Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Firmen eingekauft: Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland). Ausnahmen sind an entsprechender Stelle angegeben. Radioaktiv markiertes Phosphor ( $^{32}\text{P}$ ) und Schwefel ( $^{35}\text{S}$ -Methionin) wurde bei der Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland) bestellt. Alle verwendeten Chemikalien entsprechen dem chemischen Reinheitsgebot.

#### **2.1.3 Membranen**

Die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) wurde bei Millipore (Darmstadt, Deutschland) und die positiv geladenen Nylonmembranen bei GE Healthcare (München, Deutschland) erworben.

#### **2.1.4 Antikörper**

Kommerziell erwerbliche erste Antikörper gegen photosynthetische Polypeptide wurden von Agrisera (Väna, Schweden) erworben. Antikörper gegen D1, D2, CP47 und CP43 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Barbato (Universität Turin, Alessandria, Italien) und der Antikörper gegen Tic40 von Herrn Prof. Soll (LMU München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Antikörper gegen Aktin sowie der zweite Antikörper  $\alpha$ -mouse wurde bei Dianova (Hamburg, Deutschland) gekauft. Der zweite Antikörper  $\alpha$ -rabbit wurde bei Sigma und der GFP-Antikörper bei Life Technologies (Carlsbad, USA) bestellt.

### 2.1.5 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Sämtliche *A. thaliana* Samen (Tab. 2.1.5-1 und 2.1.5-2) waren bereits im Labor von Herrn Prof. Dr. Leister vorhanden. Alle angegebenen Wildtyp Pflanzen entsprechen dem Ökotyp Columbia (Col-0).

**Tabelle 2.1.5-1:** Verwendete publizierte T-DNA-Insertionslinien

Gen	Insertionslinie/ Genotyp	Name	Referenz
<i>At4g02770</i>	dSpm-Linie	<i>psad1-1</i>	Ihnatowicz et al., 2004
<i>At4g19100</i>	GABI-152D07	<i>pam68-1</i>	Armbruster et al., 2010
<i>At1g64150</i>	<i>pam71-1</i>	<i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71</sub>	Marquardt, 2007
<i>At1g64150</i>	<i>pam71-2</i>	<i>pam71-2</i> <sub>35S:PAM71</sub>	Marquardt, 2007

**Tabelle 2.1.5-2:** Verwendete unbeschriebene T-DNA-Insertionslinien

Gen	T-DNA-Insertionslinie	Projektname
<i>At1g64150</i>	GK-166A05	<i>pam71-1</i>
<i>At1g64150</i>	GK-094C03	<i>pam71-2</i>
<i>At1g64150</i>	<i>pam71-1</i>	<i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub>
<i>At5g66570</i>	RATM12-1816-1	<i>psbo1-3</i>
<i>At3g50820</i>	CSHL-ET9214	<i>psbo2-2</i>
WT		WT <sub>35S:PAM71-GFP</sub>

Die Samen von *A. thaliana* wurden auf feuchtem Whatman-Papier ausgelegt und zur Stratifikation und Synchronisation der Keimung für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln gelagert. Danach wurden die stratifizierten Samen auf Anzuchterde überführt und bis zum Keimen mit einem Plastikdeckel zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit versehen. Alle Pflanzen wurden im Langtag (16h Licht / 8h Dunkel) bzw. bei gleicher Tages- und Nachtlänge (12h Licht / 12h Dunkel) unter Weißlicht (80µmol Photonen m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) in der Klimakammer kultiviert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 RNA Extraktion

Zwei bis drei junge Blätter von *A. thaliana* wurden in einem Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Hilfe von Stahlkugeln oder eines Mörsers homogenisiert. Nach der Zugabe von 1ml TRI REAGENT (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) erfolgte ein Inkubationsschritt bei Raumtemperatur (RT) für 5 min, gefolgt von der Zugabe von 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Nach dreiminütigem Inkubieren bei RT wurde für 15 min bei 4°C und 16.100g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol gefällt. Auf die zehnminütige Inkubation bei RT folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 10 min und 16.100g. Ein weiterer fünfminütiger Zentrifugationsschritt erfolgte nach dem Waschen mit 75% Ethanol (EtOH). Danach wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Nach dem Rücklösen des Pellets in RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O wurde die RNA bei -80°C gelagert.

### 2.2.2 RNA Quantifizierung

Zur Qualitätskontrolle wurde die RNA in einem 2%-igem Agarosegel aufgetrennt. Die RNA-Konzentration wurde im Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) bestimmt.

### 2.2.3 Analyse der mit Polysomen assoziierten mRNA

Die Herstellung des Saccharose-Stufengradienten erfolgte über das Einfrieren der geschichteten Saccharose-Lösungen im Zentrifugationsröhrchen bei -80°C, beginnend bei der 55% Saccharose-Lösung und endend bei der 15% Saccharose-Lösung. Nach dem Auftauen des Saccharose-Stufengradienten über Nacht bei 4°C konnte der Versuch begonnen werden.

Das Blattmaterial (0,2g) wurde in Anwesenheit von flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert und mit Hilfe des Polysomen-Extraktionspuffers solubilisiert. Hierbei kam 1% Triton X-100 und 0,5% SDS zum Einsatz. Das solubilisierte Material wurde über einen 15% bis 55% Saccharose-Stufengradienten geschichtet und in der Beckman

Coulter Ultrazentrifuge (Optima™ LE-80K) bei 4°C, 42.000g für 65 min zentrifugiert. Der Saccharose-Stufengradient wurde anschließend in elf Fraktionen aufgeteilt und die mit Polysomen assoziierte mRNA mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die Fällung der mRNA erfolgte mit Hilfe von 95% Ethanol bei RT. Die Fraktionen wurden mit Hilfe von Northern Blot Analysen untersucht.

Polysomen-Extraktionspuffer

0,2M Tris-HCl pH 9,0  
 0,2M KCl  
 25mM MgCl<sub>2</sub>  
 25mM EGTA  
 0,2M Saccharose  
 1% Triton X-100  
 2% Polyoxyethylen-10-tridecyl Ether

10xPG Salze

0,4M Tris-HCl pH 8,0  
 0,2M KCl  
 0,1M MgCl<sub>2</sub>

Saccharose-Stufengradient

	<u>15%</u>	<u>30%</u>	<u>40%</u>	<u>55%</u>
70% Saccharose (ml)	6,4	13	17	24
10xPG Salze (ml)	3	3	3	3
DEPC-H <sub>2</sub> O (ml)	20,5	14	10	3,3
Heparin (100 mg/ml) (µl)	150	150	150	150
Chloramphenicol (50 mg/ml in EtOH) (µl)	60	60	60	60
Cycloheximid (10 mg/ml in H <sub>2</sub> O) (µl)	75	75	75	75



### 2.2.4 Northern Blot Analyse

Northern Blot Analysen wurden, wie in Sambrook und Russell, 2006, beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden 9µg RNA mit 4µl 30% deionisiertem Glyoxal und 2,5µl 10xMOPS versetzt und dann mit DMSO auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach der Denaturierung der RNA bei 50°C für eine Stunde wurde diese in einem 1,2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Übertragung der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte mittels Northern Blot. Hierzu wurde eine Plastikwanne mit 20xSSC gefüllt und eine Papierbrücke mit Hilfe einer Glasplatte aufgebaut. Die Papierbrücke wurde mit 10xSSC getränkt und mit dem in ddH<sub>2</sub>O gewaschenen Agarosegel bedeckt. Darauf wurde die in 10xSSC aktivierte Nylonmembran gelegt und mit einem in 6xSSC getränkten Whatman-Papier bedeckt. Auf das Whatman-Papier wurde ein ca. 5cm hoher Papierstapel geschichtet, der mit einer Glasplatte und Gewichten fixiert wurde. Diese Konstruktion ermöglichte den Fluss der Kapillarkräfte mittels unterschiedlich stark konzentrierter Puffer und wurde über Nacht, jedoch nicht länger als 16 Stunden, stehen gelassen. Zur Fixierung der RNA auf der Nylonmembran wurde die Membran anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Zur Qualitätskontrolle wurde die Membran mit Methylenblau gefärbt.

Zur Prä-Hybridisierung der Membran wurde der 60°C warme Hybridisierungspuffer mit 0,8% denaturierter Hering-Sperma-DNA (Invitrogen, Carlsbad, USA) ergänzt. Die Membran wurde in dieser Lösung über Nacht in einem 65°C warmen Ofen inkubiert. Zur Probenaufbereitung wurden 4µl PCR-Produkt mit 6µl Wasser versetzt und denaturiert (5 min, 100°C). Es folgte die Zugabe von 4µl 5xOLB, 4µl <sup>32</sup>PdCTP und 1µl DNA Polymerase I (Klenow) Fragment (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland). Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Probe mittels Illustra MicroSpin™ S-200 HR Säulen (GE Healthcare) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Die so hergestellte Sonde wurde denaturiert und der Hybridisierungslösung zugegeben. Ergänzend wurde 0,2% denaturierte Hering-Sperma-DNA hinzugefügt.

Nach einer Inkubation über Nacht wurde die Membran erst 30 min, dann 15 min mit 60°C warmen Waschpuffer im 65°C warmen Ofen gewaschen. Es folgte ein letzter Waschschriff mit 1xRT Puffer für eine Stunde bei RT. Die Membran wurde für 24 Stunden auf einem radioaktiv-sensitiven Film exponiert und die Signale mit Hilfe des

Phosphoimagers (Typhoon Trio, Amersham Biosciences) detektiert. Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3.1-2 aufgelistet.

<u>10xMOPS</u>	<u>20xSSC</u>	<u>Methylenblau</u>	
0,2M MOPS	3M NaCl	0,02% (w/v) Methylenblau	
50mM Natriumacetat	0,2ml 0,5M EDTA	0,3M Natriumacetat pH 5,5	
10mM EDTA	0,3 Natriumcitratx2H <sub>2</sub> O		
auf pH 7,0 einstellen	auf pH 7,0 einstellen		
autoklavieren	autoklavieren		
<u>Hybridisierungspuffer</u>	<u>20xSSPE</u>	<u>Waschpuffer</u>	<u>1xRT Puffer</u>
7% SDS	20mM EDTA	0,1% SDS	6mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O
0,25M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2xSSPE	1mM EDTA
0,25M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3M NaCl		0,2% SDS
pH 7,0	auf pH 7,4 einstellen		
	autoklavieren		
<u>5xOLB</u>	<u>Lösung 0</u>	<u>TE-Puffer</u>	
133µl Lösung A	1,25M Tris-HCl pH 8,0	10mM Tris-HCl pH 8,0	
333µl Lösung B	0,125M MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	1mM EDTA	
200µl Lösung C			
<u>Lösung A</u>	<u>Lösung B</u>	<u>Lösung C</u>	
1ml Lösung 0	2M Hepes pH 6,6	2,5mg Hexadesoxyribonukleotide	
18µl 2-Mercaptoethanol		(Roche, Penzberg, Deutschland) in 250µl	
je 5µl dATP, dTTP, dGTP		TE-Puffer	
(100mM, pH 7,0)			

## 2.2.5 Herstellung von cDNA

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mittels des iScript cDNA Synthesis Kits von Biorad nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.6 DNA Extraktion

Zur DNA-Gewinnung wurden ein bis zwei kleine Blätter von *A. thaliana* in 400µl DNA-Extraktionspuffer in der Kugelmühle (TissueLyser II von Retsch/Qiagen) bei 30kHz 3 min lang mit Hilfe zweier Stahlkugeln zerkleinert. Nach einer Inkubation bei 37°C für 5 min folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei RT und 16.100g. Der Überstand wurde mit 300µl Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 15 min bei RT und 16.100g. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen.

Das an der Luft getrocknete DNA-Pellet wurde final in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen (Liu et al., 1995).

#### Extraktionspuffer

100mM Tris-HCl pH 7,5-8,5

100mM NaCl

50mM EDTA pH 8

2% SDS

### 2.2.7 Standard-PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte eine PCR mit folgendem Programm (Tab. 2.2.7-1):

**Tabelle 2.2.7-1:** PCR-Programm einer Standard-PCR

PCR-Programm	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94°C	3 Minuten
Denaturierung	94°C	30 Sekunden
Primer Anlagerung	55°C	30 Sekunden
Elongation	72°C	50-60 Sekunden
Wiederholung von Denaturierung bis Elongation, 32 mal		
Finale Elongation	72°C	5 Minuten
Kühlung	16°C	Für immer

Die Standard-PCR wurde in einem Ansatz (Tab. 2.2.7-2) von 10µl mit folgenden Komponenten durchgeführt:

**Tabelle 2.2.7-2:** PCR-Ansatz für eine Standard-PCR

<b>Ansatz</b>	<b>µl</b>
<b>Wasser</b>	6,36
<b>10xPuffer</b>	1
<b>dNTPs (1mM)</b>	1
<b>Primer sense</b>	0,3
<b>Primer antisense</b>	0,3
<b>Taq-Polymerase</b>	0,04
<b>DNA</b>	1

Sämtliche Primer sind in Tabelle 2.3.1-1 (Kapitel 2.3 Anhang) aufgeführt.

### 2.2.8 Agarosegel-Elektrophorese

DNA wurde mit Ladepuffer versetzt und in 1-2%-igen Agarosegelen mit Ethidiumbromid (0,2µg/ml) in TAE Puffer bei einer Spannung von 80V elektrophoretisch aufgetrennt. Der „GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) kam als Längenstandard zum Einsatz. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht.

#### TAE Puffer

40mM Tris-HCl pH 8,0

1mM EDTA

40mM Essigsäure

#### 6x Ladepuffer:

30% (v/v) Glycerin

120mM EDTA

0,25% (w/v) Bromphenolblau

0,25% (w/v) Xylencyanol

### 2.2.9 Isolation von Gesamtprotein

Blätter von vier Wochen alten Pflanzen wurden im Ladepuffer homogenisiert, und die Proteine bei 65°C denaturiert und gleichzeitig solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 15.000g für 10 min abzentrifugiert. Proben, die 10mg Frischgewicht Blattmaterial entsprachen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und Proteine mittels Western Blot Analyse detektiert.

Ladepuffer

0,225 M Tris-HCl pH6.8

50% Glycerol

5% SDS

0,05% Bromphenolblau

0,25 M DTT

**2.2.10 Isolation von intakten *A. thaliana* Chloroplasten zur Proteinanalyse**

Intakte Chloroplasten wurden mit Hilfe eines Percollgradienten isoliert. Der Gradient bestand aus zwei Schichten unterschiedlicher Dichte: Die obere Schicht enthielt 40% Percoll-Lösung, 20% 5xRB und 40% ddH<sub>2</sub>O; die untere Schicht bestand aus 80% Percoll-Lösung und 20% 5xRB.

Über Nacht dunkel adaptierte Pflanzen wurden in 6ml Homogenisationspuffer pro 1g Blattmaterial bei 4°C homogenisiert und durch zwei Lagen Miracloth (Millipore) gefiltert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1.500g für 5 min, woraufhin das Pellet vorsichtig in einem kleinen Volumen 1xRB resuspendiert wurde. Die Chloroplasten wurden auf den Percollgradienten geladen und nochmals bei 4°C und 3.000g ohne Bremse für 10 min in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die obere Bande mit aufgebrochenen Chloroplasten wurde verworfen, und die untere Bande, welche die intakten Chloroplasten enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Waschschrift mit 1xRB und eine Zentrifugation bei 4°C und 1.500g für 5 min. Das entstandene Pellet wurde im Lysis Puffer resuspendiert.

5xRB

0,3M Sorbitol

20mM Tricin-KOH pH 8,4

2,5mM EDTA

5mM MgCl<sub>2</sub>Homogenisationspuffer

0,4M Sorbitol

20mM Tricin-KOH pH 8,4

10mM EDTA

5mM NaHCO<sub>3</sub>

0,1% BSA

Lysis Puffer

10mM Hepes-KOH pH 7,6

5mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.2.11 Fraktionierung von Chloroplasten

Nach dem Aufbrechen der intakten Chloroplasten mittels Lysis Puffer und mechanischer Belastung wurden 2ml der Chloroplasten-Suspension auf einen Saccharose-Stufengradienten geladen. Der Gradient setzte sich von unten nach oben aus 1,2M Saccharose-, 1,0M Saccharose- und 0,46M Saccharose-Lösung zusammen. Nach dem Zentrifugieren für 2 Stunden, 58.000g bei 4°C in der Beckman Coulter Ultrazentrifuge (Optima™ LE-80K) konnte das Stroma, welches sich in der obersten Fraktion befand, die Hüllmembranen in der mittleren Fraktion und das Thylakoidpellet gewonnen werden.

Das Einengen der Hüllmembranen erfolgte durch die Verdünnung der gewonnenen Fraktion mittels Lysis Puffers und erneutem Zentrifugieren bei 135.200g für eine Stunde bei 4°C in der Ultrazentrifuge.

Das Thylakoidpellet wurde in TMK Puffer resuspendiert. Das Stroma musste nicht weiter aufgearbeitet werden. Die Fraktionen wurden mittels Western Blot Analysen untersucht.

#### Lysis Puffer

10mM Hepes-KOH pH 7,6  
5mM MgCl<sub>2</sub>

#### TMK Puffer

10mM Tris-HCl pH 6,8  
10mM MgCl<sub>2</sub>  
20mM KCl

#### Saccharose-Lösung

Saccharose gelöst in Lysis Puffer

### 2.2.12 *In vivo* Labelling mit <sup>35</sup>S-Methionin

Die radioaktive Markierung von Proteinen wurde gemäß Pesaresi et al., 2001 durchgeführt. Hierzu wurden einige Blätter von drei Wochen alten Pflanzen in PC-Puffer in Anwesenheit von Cycloheximid (Hemmung der Synthese kernkodierter Proteine) mit Hilfe eines Exsikkators infiltriert. Es folgte eine zweite Infiltration der Blätter in 440µl frischem PC-Puffer und 60µl <sup>35</sup>S-Methionin. Die behandelten Blätter wurden anschließend für eine Stunde unter Weißlicht (100µmol Photonen m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) adaptiert. Daraufhin wurden die Blätter in T2 Puffer homogenisiert und Thylakoide mittels Zentrifugation bei 4°C und 16.100g für 10 min pelletiert. Nach dem Solubilisieren der Proteine wurden diese in einem denaturierenden SDS-Glycin-Gel (8%-12% Polyacrylamid, 6M Harnstoff) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die

Signale wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers (Typhoon Trio, Amersham Biosciences) detektiert.

#### PC-Puffer

5ml TMK Puffer (siehe 2.3.5)

10µl Tween 20

200µl Cycloheximid (20µg/ml)

#### T2 Puffer

20mM Hepes pH 7,5 mit KOH

10mM EDTA pH 8,0

### **2.2.13 Saccharose-Gradient: PSII, PSI und LHCII Isolation**

Das Blattmaterial (20g) von vier Wochen alten Pflanzen wurde in 100ml Isolationspuffer mit Hilfe eines Mixers zerkleinert und durch eine Doppellage Miracloth gefiltert. Nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 6.000g und 4°C wurde das Thylakoidpellet zweimal mit EDTA-Waschpuffer gewaschen, nochmals zentrifugiert und dann in einer finalen Konzentration von 2mg Chlorophyll a+b in 1ml ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Durch Zugabe von einem ml 2% β-DM (finale Konzentration: 1% β-DM) wurden die Proteinkomplexe aus der Membran gelöst. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis folgte die Zentrifugation bei 4°C für 10 min und 16.100g. Der Überstand wurde auf einen kontinuierlichen 0,1M bis 1,0M Saccharose-Gradienten geladen und für 21 Stunden in der Ultrazentrifuge bei 33.000Upm (Rotor: SW60Ti) zentrifugiert. Anschließend wurde der kontinuierliche Saccharose-Gradient in 18 Fraktionen aufgeteilt und mittels Western Blot Analyse untersucht.

#### Isolationspuffer

25mM MES pH 6,5

0,33M Saccharose

5mM MgCl<sub>2</sub>

1,5mM NaCl

0,1M NaF

#### EDTA-Waschpuffer

5mM EDTA pH 7,8

#### Saccharose Lösung

Saccharose gelöst in 5mM

Tricin-NaOH pH 8,0

0,05% β-DM

### **2.2.14 Thylakoidmembran-Isolierung**

Das Pflanzenmaterial (15g) wurde in 40ml gekühltem Homogenisationspuffer T1 zerkleinert und durch eine Doppellage Miracloth gefiltert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 5.000g und 4°C wurde das Thylakoidpellet im vorgekühlten Puffer T2

resuspendiert. Die folgende 20-minütige Inkubation auf Eis stellte einen osmotischen Schock für vorhandene Chloroplasten dar, woraufhin diese aufbrachen. Es wurde eine weitere Zentrifugation mit 11.250g bei 4°C für 10 min durchgeführt. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen (1-2ml) des TMK Puffers aufgenommen.

<u>T1 Puffer</u>	<u>T2 Puffer</u>	<u>TMK Puffer</u>
0,5% Milchpulver	20mM Hepes pH 7,5 mit KOH	10mM Tris-HCl pH 6,8
0,4M Sorbitol	10mM EDTA pH 8,0	10mM MgCl <sub>2</sub>
0,1M Tricin pH 7,8 mit KOH		20mM KCl

#### Protease-Inhibitoren für Puffer T1/T2

100mM PMSF in EtOH gelöst

100mM Benzamidin in 20mM Hepes pH 7,5 gelöst

500mM Aminocapron Säure in H<sub>2</sub>O gelöst

### **2.2.15 Waschen von Thylakoidmembranen mit verschiedenen Salzen**

Isolierte Thylakoidmembranen (2.2.14) (entsprechend 0,5mg Chlorophyll a+b) wurden in 200µl 2M NaCl, 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2M NaSCN, 0,1M NaOH, 6M Urea oder als Kontrolle ohne Salz aufgenommen und 30 min auf Eis gewaschen. Lösliche und unlösliche Proteine wurden mittels Zentrifugation bei 4°C und 13.200g für 10 min separiert. Die Proteine wurden mittels Western Blot Analyse und spezifischer Antikörper detektiert (Karnauchov et al., 1997).

### **2.2.16 Thermolysin Behandlung**

Bei der Thermolysin Behandlung wurden Thylakoidmembranen (2.2.14) mit einer Konzentration von 50µg Chlorophyll / ml HM-Puffer mit 50µg / ml Thermolysin versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von EDTA pH 8,0 mit einer finalen Konzentration von 20mM wurde die Reaktion gestoppt; anschließend wurden die Thylakoide durch Zentrifugieren bei 4°C und 15.000g für 10 min pelletiert. Nach dem Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proben an Hand eines Immunoblots analysiert.



HM-Puffer

10mM Hepes-KOH pH 8,0

5mM MgCl<sub>2</sub>**2.2.17 Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Blattmaterial wurde von vier Wochen alten Pflanzen gewonnen. Thylakoidmembranen wurden wie bereits beschrieben (2.2.14) isoliert. Die Thylakoidmembranen (entsprechend 20µg Chlorophyll a+b) wurden viermal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 10 min auf Eis in 20µl Solubilisierungspuffer in Anwesenheit von 1% β-DM inkubiert. Solubilisierter Proteinkomplexe wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 16.100g für 10 min von nicht solubilisierten Proteinkomplexen getrennt. Der Überstand wurde mit Ladepuffer ergänzt. Die Proben wurden auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel (4%-12%) geladen und bei 4°C für 17 Stunden aufgetrennt. Hierzu wurde ein mit Coomassie angefärbter Kathodenpuffer und ein ungefärbter Anodenpuffer verwendet. Anschließend wurde das Gel in H<sub>2</sub>O entfärbt.

Waschpuffer

25mM Bis-Tris-HCl pH 7,0

20% Glycerin

Solubilisierungspuffer

25mM Bis-Tris-HCl pH 7,0

20% Glycerin

1% β-DM

10xLadepuffer

0,1M Bis-Tris-HCl pH 7,0

0,75M Aminocapron Säure

5% Coomassie-G 250

10xKathodenpuffer

500mM Tricin pH 7,0

150mM Bis-Tris pH 7,0

0,2% Coomassie-G 250

10xAnodenpuffer

500mM Bis-Tris pH 7,0

**2.2.18 Chlorophyllbestimmung für SDS-PAGE**

Zur Chlorophyllbestimmung wurden jeweils 5µl Thylakoidsuspension mit 995µl 80% Aceton verdünnt und für 5 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Um die gefällten Proteine zu pelletieren, erfolgte eine Zentrifugation bei 16.100g für 10 min bei 4°C. Die Messung im Spektrometer fand bei 750nm, 664nm und 647nm statt. Der Chlorophyll a+b-Gehalt wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b} = K1 \cdot (A3 - A1) + K2 \cdot (A2 - A1)$$

mit den Konstanten  $K1 = 17,76$   $K2 = 7,34$

und mit den Absorptionen  $A1 = A(750\text{nm})$   $A2 = A(664\text{nm})$   $A3 = A(647\text{nm})$

(Porra, 2002)

### 2.2.19 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit reduzierendem Ladepuffer versetzt, 10 min bei 80°C bzw. 2 min bei 70°C denaturiert und 1 min bei 2.000g abzentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) vorgenommen. Als Längenstandard diente der „Page Ruler Prestained Protein Marker“ (Fermentas).

<u>Ladepuffer</u>	<u>Laufpuffer</u>
0,225 M Tris-HCl pH6.8	200mM Glycin
50% Glycerol	25mM Tris
5% SDS	0,1% SDS
0,05% Bromphenolblau	
0,25 M DTT	

### 2.2.20 Western Blot

Das Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) mit der Porengröße 0,45µm erfolgte mittels einer Trans-Blot SD „Semi-Dry Transfer“ Kammer (Bio-Rad, München, Deutschland). Die auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene Membran wurde für 1 min in Methanol aktiviert, bevor sie kurz mit Wasser gewaschen und bis zum Gebrauch im Kathodenpuffer inkubiert wurde. Einzelne Whatman-Papiere wurden mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II oder Kathodenpuffer getränkt. Der Aufbau des Blots von der Anode zur Kathode gliederte sich wie folgt: zwei Whatman-Papiere Anodenpuffer I, ein Whatman-Papier Anodenpuffer II, aktivierte Membran, Polyacrylamidgel, drei Whatman-Papiere Kathodenpuffer. Es wurde für 55 min, abhängig von der Dicke des Gels, bei zwei Stromstärken 1,0mA/cm<sup>2</sup> bzw. 1,5mA/cm<sup>2</sup> geblottet.

Anschließend konnte der Blot für die Immunodetektion verwendet werden.

<u>Kathodenpuffer</u>	<u>Anodenpuffer I</u>	<u>Anodenpuffer II</u>
25mM Tris pH 9,4	0,3M Tris pH 10,4	25mM Tris pH 10,4
40mM Glycin	10% Methanol	10% Methanol
10% Methanol		

### 2.2.21 Immunodetektion

Proteinbanden wurden durch Immunodetektion visualisiert. Hierzu wurden die freien Bindestellen der Membran mit einer fünfprozentigen Magermilchlösung in TBST für eine Stunde geblockt. Darauf folgte der primäre Antikörper für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran 3x10 min in TBST gewaschen und dann im sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem 3x10-minütigen Waschschrift mit TBST erfolgte die Detektion der Proteinbanden an Hand der Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL-Readers (Fusion FX7, Peqlab, Erlangen, Deutschland) unter Anwendung des ECL Kits (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Thermo Scientific) nach Vorgaben des Herstellers.

<u>20xTBS</u>	<u>TBST</u>
3M NaCl	1xTBS
200mM Tris-HCl pH 8,6	0,1% Tween 20

### 2.2.22 Chlorophyll a Fluoreszenz-Messung

*In vivo* Chlorophyll a Fluoreszenz-Messungen an einzelnen Blättern wurden mit dem Imaging-PAM und dem Dual-PAM 100 Fluometer (Walz, Deutschland) wie von Varotto et al., 2000 und dem Review-Artikel: Maxwell und Johnson, 2000 beschrieben durchgeführt. Nach der Dunkeladaption der Pflanze für 30 min wurde die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) gemessen. Um die maximale Fluoreszenz ( $F_M$ ) zu bestimmen, wurde ein Puls (0,8 sek) mit Blaulicht bzw. Rotlicht (Imaging-PAM:  $36\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , Dual-PAM:  $5.000\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) gesetzt. Es folgte die Berechnung des Verhältnisses von  $(F_M - F_0)/F_M = F_V/F_M$ , der maximalen Ausbeute des PSII („*maximal quantum yield of PSII*“). Um den Elektronenfluss zwischen PSII und PSI aufrecht zu

erhalten, erfolgte eine Belichtung mit aktinischem Licht (AL) ( $62\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) für 15 min zur Bestimmung der „*steady state*“ Fluoreszenz ( $F_s$ ). Ein weiterer saturierender Puls ( $5.000\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) diene der Bestimmung von  $F_m'$ . Die effektive Ausbeute des PSII („*effective quantum yield of PSII*“:  $\Phi_{II}$ ) errechnete sich aus  $(F_m' - F_s)/F_m'$ .

### 2.2.23 P700 Absorptionsmessung

Um den Redox-Status des P700 zu messen, wurde das Dual-PAM 100 Fluometer verwendet. Die Einschätzung der Quantenausbeute von PSI ( $\Phi_I$ ) basiert auf der licht-induzierten *in vivo* Absorptionsveränderung des P700 bei 830nm.

$$\Phi_I = 1 - \Delta a / \Delta a_{\max}$$

Dabei stellt der Quotient  $\Delta a / \Delta a_{\max}$  das Verhältnis des nicht oxidierten P700 zu  $P700_{\text{total}}$  dar.

Zunächst wurde  $\Delta a$  direkt nach der Unterbrechung des aktinischen Lichts ( $100\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), welches das gemessene Blatt für 4 min 35 sek bestrahlte, dokumentiert, dann wurde  $a_{\max}$  durch die Belichtung mit dunkelrotem Licht ( $260\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) induziert. Nach dem Ausschalten des dunkelroten Lichts nach 25 sek konnte der exakte  $\Delta a_{\max}$  Wert bestimmt werden (modifiziert von Meurer et al., 1996).

### 2.2.24 Gewinnung bioinformatischer Informationen

Proteinsequenzen wurden der Aramemnon-Datenbank (<http://www.aramemnon.uni-koeln.de>; Schwacke et al., 2003) und dem „National Center of Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Die Accesion-Nummern sind im Anhang (2.3.3) zu finden. Der Abgleich der Proteinsequenz von PAM71 mit der Datenbank von ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>; Ferro et al., 2010) lieferte Informationen über das Signalpeptid und der Abgleich mit UniProt (<http://www.uniprot.org>; UniProt, 2014) die Anzahl der Membranspannen. Mit Hilfe von Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; Corpet, 1988) wurden die zwei möglichen Kalzium-Bindestellen ermittelt und der Sequenz-Abgleich homologer Proteine durchgeführt. Die Datenbank „Calmodulin Target Database“

(<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>; Yap et al., 2000) sagte eine mutmaßliche Calmodulin-Bindestelle für PAM71 voraus. Die Darstellung der PAM71 Proteinstruktur wurde in dem Computerprogramm VectorNTI vorgenommen.

Mit Hilfe von ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>; Larkin et al., 2007) und dessen Funktion „Rooted phylogenetic tree (UPGMA)“ wurde ein Stammbaum erstellt.

## 2.3 Anhang

### 2.3.1 Amplifikationsprimer

**Tabelle 2.3.1-1:** Amplifikationsprimer für die Genotypisierung von Mutanten

Primer	Sequenz (5' → 3')
1g64150-1F	TCT TGA TGT TCT GGT TGA GTC ATC G
1g64150-1R	ACT GAA CCA AAA CCA AAA CAA AAC
1g64150-F	AAT TCT CCT GAA ACT TGG AAG ACA
1g64150-R	TTC GGT CTT TAG AAC ACA CTC TCT
1g64150-RT2-F	CAA GAA GAG AGA TTC AGA GAG TTC
1g64150-RT2-R	GAA ACA GAA CTC CTC CGA CAT AAG
35S-F	GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA AG
At5g66570-F	TGT TGT TGA AGA TCA ATT GGA CA
At5g66570-R	TGA ATC GAA GAT TAC AGA ATTGGA
CSHL-Ds3-4	CCG TCC CGC AAG TTAAAT ATG
ET9214-F	TTC ATT CGT TGT GTC TTC TTT CTC
ET9214-R	GTA TCT CGT CGT ACG TTA GCC TCT
GFP-R	CTT CAG GGT CAG CTT GCC GTA
GK-LB	ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC
RATM-Ds5-2a	TCC GTT CCG TTT TCG TTT TTT AC
Ubiquitin-F	CTG TTC ACG GAA CCC AAT TC
Ubiquitin-R	GGA AAA AGG TCT GAC CGA CA

**Tabelle 2.3.1-2:** Amplifikationsprimer für Northern Blots

Gen	Sense Primer (5' → 3')	Antisense Primer (5' → 3')
<i>psbA</i>	CGG CCA AAA TAA CCG TGG C	TAT ACA ACG GCG GTC CTT ATG
<i>psbB</i>	GTT CTT GAT CCA ATG TGG AG	TTC CGG TTA GTC CAT AAG GG
<i>psbC</i>	TAG CTT TAG CTG GTC GTG AC	GAA AGG CAC CTA CAC CTA AC
<i>rbcL</i>	CGT TGG AGA GAC CGT TTC TT	CAA AGC CCA AAG TTG ACT CC

### 2.3.2 Antikörper

**Tabelle 2.3.2-1: Antikörper**

Antikörper gegen	Bestellnummer	Herkunft	2. Antikörper
Aktin	MA1-774	Dianova	$\alpha$ -mouse
ATPase ( $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit)	AS05-085	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
CP43	--	Prof. Barbato	$\alpha$ -rabbit
CP47	--	Prof. Barbato	$\alpha$ -rabbit
Cyt $b_6$	AS03-034	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
D1	--	Prof. Barbato	$\alpha$ -rabbit
D2	--	Prof. Barbato	$\alpha$ -rabbit
GFP	A6455	Life Technologies	$\alpha$ -rabbit
Lhca2	AS01-006	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
Lhcb2	AS01-003	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -mouse IgG HRP	115-035-062	Dianova	
PsaA	AS06-172	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
PsaB	AS10-695	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
PsaD	AS04-046	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
PsbO	AS05-092	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
PsbP	AS06-142-23	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
PsbR	AS05-059	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
$\alpha$ -rabbit IgG HRP	A9169	Sigma	
RbcL	AS01-017	Agrisera	$\alpha$ -rabbit
Tic40	--	Prof. Soll	$\alpha$ -rabbit

### 2.3.3 Accession-Nummern

#### Accession-Nummern des Abgleichs (Kapitel 3.11)

*A. thaliana* (At1g64150): AAK73997.1

*A. thaliana* (At4g13590): NP\_193095.2

*Anabaena* sp.: WP\_016950136.1

*Aspergillus nidulans*: XP\_662418.1

*Caenorhabditis elegans*: NP\_497567.1

*Chlamydomonas reinhardtii*: EDP06890.1

*Chlamydomonas reinhardtii*: XP\_001701915.1

*Drosophila melanogaster*: ACR20070.1

*Geobacter sulfurreducens*: ADI83700.1

*Homo sapiens*: AAI04981.1

*Mycobacterium vaccae*: WP\_003929982.1

*Oryza sativa*: BAD81293.1

*Oryza sativa*: BAD81370.1

*Physcomitrella patens*: EDQ78728.1

*Physcomitrella patens*: XP\_001756332.1

*Saccharomyces cerevisiae*: GAA21732.1

*Synechocystis sp.*: BAA10348.1

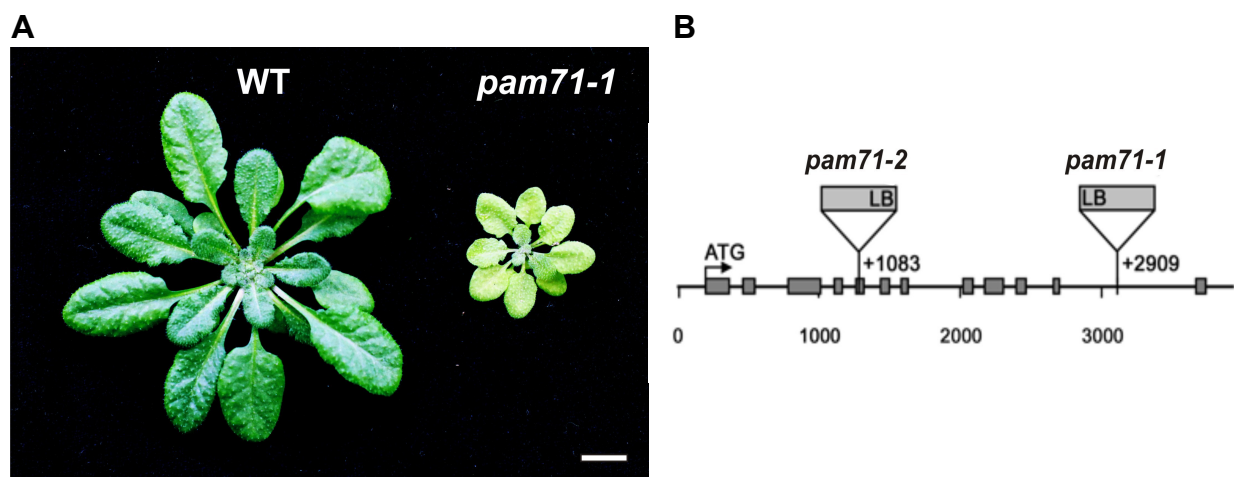
*Thermomonospora curvata*: ACZ00248.1

*Thermosynechococcus elongatus*: WP\_011056234.1

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phänotyp der Mutanten

Das Gen *At1g64150* kodiert das Protein PAM71. Mutanten, in denen dieses Gen mit Hilfe einer T-DNA ausgeschaltet wurde, zeigten auf Grund des Fehlens von PAM71 einen Wachstumsphänotyp. Wie in Abbildung 3.1-1A ersichtlich war die *pam71-1* Mutante, die eine T-DNA-Insertion im elften Intron (Abb. 3.1-1B) trug (GK-166A05), deutlich kleiner als der Wildtyp (WT) und ließ ein verlangsamtes Wachstum erkennen. Im Vergleich zum WT, der eine dunkelgrüne Färbung der Blätter besaß, war die *pam71-1* Mutante hellgrün gefärbt. Die *pam71-2* Mutante (GK-094C03), die eine T-DNA-Insertion im fünften Exon des *At1g64150*-Gens (Abb. 3.1-1B) trug, zeigte den gleichen Wachstumsphänotyp wie die *pam71-1* Mutante.



**Abbildung 3.1-1:** Wachstumsphänotyp von 5 Wochen alten WT und *pam71-1* Pflanzen und schematische Darstellung der *pam71* Gensequenz

A: Foto einer WT Pflanze und *pam71-1* Mutante. Im Vergleich zum WT war *pam71-1* kleiner und besaß eine hellgrüne Färbung der Blätter. Der weiße Balken entspricht 1cm.

B: Darstellung des *At1g64150*-Gens. Die T-DNA-Insertion der *pam71-1* Mutante liegt im 11. Intron, die der *pam71-2* Mutante im 5. Exon. (Ausarbeitung und Abbildung: Daniel Marquardt, 2007)

Die Homozygotie der T-DNA-Insertion wurde mittels PCR-Analyse (Abb. 3.1-2A) bestätigt. Hierzu wurden Gen-spezifische Primer (*At1g64150*-F + R und *At1g64150*-1F + 1R) und T-DNA-spezifische Primer (*At1g64150*-F + GK-LB und *At1g64150*-1F + GK-LB) verwendet. Als Nachweis einer „Knock-out“ Mutation, in der keine Transkription



des Gens mehr stattfindet, wurden in der *pam71-1* und *pam71-2* Mutante semiquantitative PCR-Analysen (Abb. 3.1-2B) durchgeführt. Hierbei diente RNA, welche anschließend in cDNA umgeschrieben wurde, als Matrizen-Strang. Die semiquantitative PCR mit Gen-spezifischen Primern (At1g64150-RT2-F + At1g64150-RT2-R) bewies, dass kein *PAM71* Transkript in den *pam71* Mutanten vorhanden war. Als Ladekontrolle dienten Ubiquitin-spezifische Primer.



**Abbildung 3.1-2:** PCR-Analyse von *pam71-1* und *pam71-2*

A: PCR Analyse als Nachweis der Homozygotie der T-DNA-Insertion

B: Semiquantitative PCR zur Analyse der *PAM71* Transkriptmenge. Als Ladekontrolle diente Ubiquitin.

n.K.: Negativkontrolle: Wasser

Um sicher zu stellen, dass der Phänotyp der *pam71-1* und *pam71-2* Mutante auf dem Ausschalten des *At1g64150*-Gens und dem Fehlen des *PAM71* Proteins beruht, wurden beide Mutanten mit der cDNA des *At1g64150*-Gens komplementiert (Marquardt, 2007). In die *pam71-1* Mutante wurde zusätzlich die cDNA eingebracht, die für das *PAM71*-GFP Fusionsprotein kodiert (Ausarbeitung und Durchführung: Gabi Burkhard, Dr. Anja Schneider). Die entstandenen Mutanten *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub>, *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> besaßen einen wildtypischen Phänotyp. Auch in den WT wurde als Kontrolle cDNA, die für das *PAM71*-GFP Fusionsprotein kodiert, eingebracht (Ausarbeitung und Durchführung: Gabi Burkhard, Dr. Anja Schneider). Die Linie WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub> behielt ihr wildtypisches Aussehen.

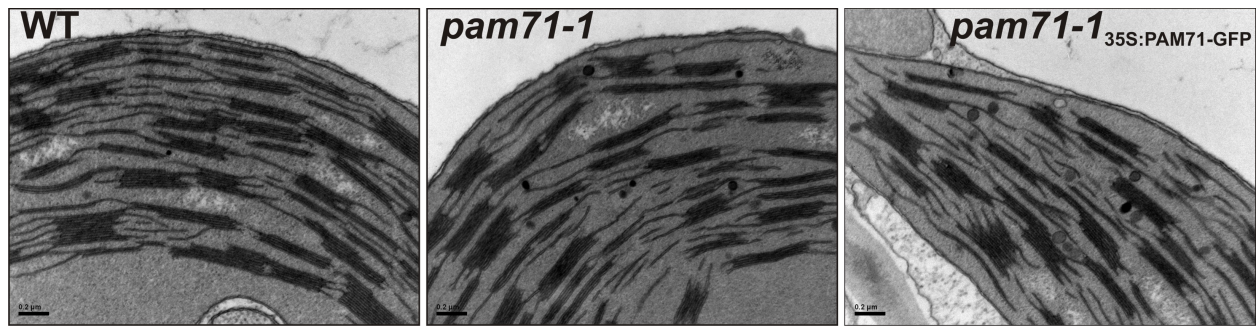
Hinsichtlich der hellgrünen Färbung der Blätter der *pam71* Mutanten war es von Interesse, den Chlorophyll-Gehalt pro Blatt-Frischgewicht zu ermitteln. Die Werte sind in Tabelle 3.1-1 aufgeführt. Interessanterweise erreichte keine der komplementierten

Linien den Chlorophyll-Gehalt des WT. Besonders ins Auge fiel die *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> Mutante, die trotz ihrer wildtypischen Größe der Pflanzen einen Chlorophyll-Gehalt von 58% im Vergleich zum WT aufwies. Dies entsprach in etwa dem Chlorophyll-Gehalt der *pam71* Mutanten.

**Tabelle 3.1-1:** Chlorophyll-Gehalt der einzelnen Pflanzenlinien

Pflanzenlinie	Chlorophyll-Gehalt pro 5mg Blatt-Frischgewicht	Chlorophyll-Gehalt in %
WT	9,16 ± 0,06µg	100%
<i>pam71-1</i>	4,88 ± 1,29µg	53%
<i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71</sub>	6,60 ± 0,01µg	72%
<i>pam71-2</i>	5,42 ± 0,09µg	59%
<i>pam71-2</i> <sub>35S:PAM71</sub>	7,50 ± 1,62µg	82%
<i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub>	5,33 ± 1,28µg	58%
WT <sub>35S:PAM71-GFP</sub>	7,83 ± 2,33µg	85%

In Hinblick auf die geringe Größe und die hellgrüne Färbung der *pam71-1* Mutante wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten gemacht, um zu überprüfen, ob ein Defekt auf subzellulärer Ebene vorlag. Im Fokus stand dabei die Komposition der Thylakoidmembran. Die Aufnahmen (Abb. 3.1-3) von intakten Chloroplasten von WT, *pam71-1* und *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> bestätigten in allen drei Linien die klassische Thylakoidmembran-Schichtung in Grana-Stapel und Stromalamellen. Somit war hinsichtlich dieses Merkmals kein drastisch veränderter Phänotyp in der *pam71-1* oder *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> Mutante zu erkennen.

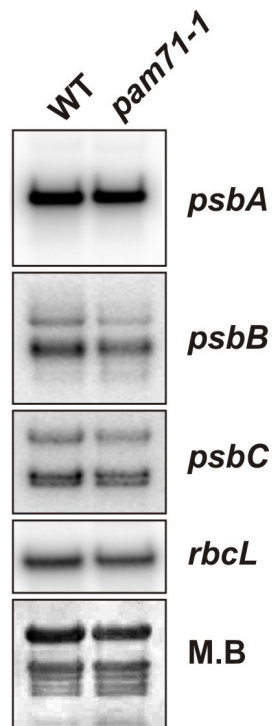


**Abbildung 3.1-3:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von WT, *pam71-1* und *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> Chloroplasten

Sowohl WT, als auch *pam71-1* und *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> besaßen die klassische Komposition der Thylakoidmembran in Grana-Stapel und Stromalamellen. Der Balken entspricht 0,2μm. (Aufarbeitung und Foto: Stefan Geimer)

### 3.2 Transkription

Auf Grund des Erscheinungsbildes der *pam71-1* Mutante stellt sich die Frage, was den kleineren Habitus und die hellere Färbung der Blätter im Vergleich zum WT verursacht. Um zu überprüfen, ob eine Störung der Transkription von Genen vorliegt, die für Proteine kodieren, welche in der Photosynthese benötigt werden, wurden Northern Blot Analysen (Abb. 3.2-1) durchgeführt. Dabei wurde RNA von WT und *pam71-1* Pflanzen auf eine Nylonmembran übertragen und mit entsprechenden Sonden hybridisiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines radioaktiv-sensitiven Screens sichtbar gemacht. Als Vertreter für Proteine des PSII wurden die Gene *psbA*, *psbB* und *psbC* ausgewählt. Diese Gene kodieren die Proteine D1, CP47 und CP43. Zusätzlich wurde das *rbcL* Gen analysiert. Dieses kodiert die große Untereinheit von RubisCO. Da kein Unterschied in der Expression von WT und *pam71-1* der jeweiligen Gene erkennbar war, kann davon ausgegangen werden, dass kein Defekt in der Transkription dieser getesteten Gene besteht.



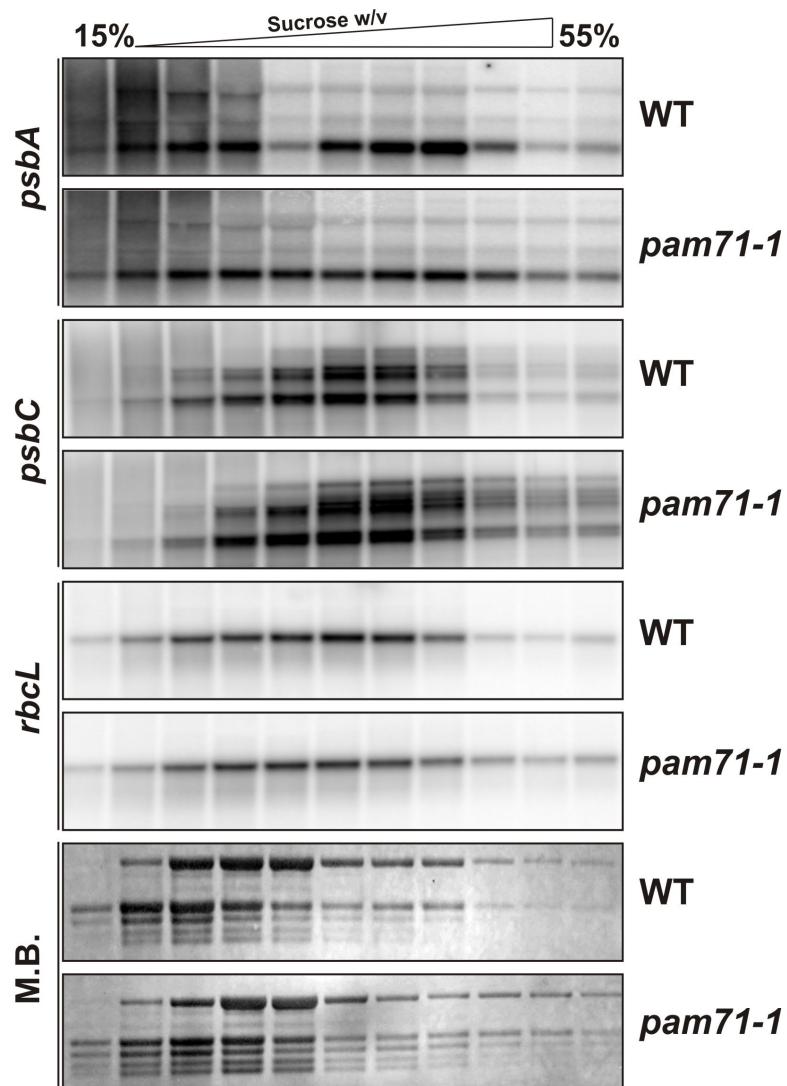
**Abbildung 3.2-1:** Analyse der Expression von Genen, die für Untereinheiten des PSII kodieren, in WT und *pam71-1* Pflanzen

Zur Analyse der Genexpression wurden 9µg RNA in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Northern Blot auf eine positiv geladenen Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit Sonden von *psbA*, *psbB*, *psbC* und *rbcL*. Als Ladekontrolle wurde die Färbung mit Methylenblau (M.B) verwendet.

### 3.3 Analyse der mit Polysomen assoziierten mRNA

Defekte in der Initiierung der Translation können mit Hilfe einer reduzierten Assoziation der mRNA an Ribosomen detektiert werden. Die verminderte Anlagerung von mRNA an Ribosomen kann darauf hinweisen, dass der Defekt translationalen Ursprungs ist oder ein Problem mit der Initiierung oder frühen Elongation besteht. Aus Pflanzenmaterial von WT und *pam71-1* Mutanten wurde, nach der Ultrazentrifugation über einen Saccharose-Stufengradienten mit anschließender Fraktionierung, RNA isoliert. Die RNA wurde mittels Northern Blot auf eine Nylonmembran übertragen und mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Fragmenten der Gene *psbA*, *psbC* und *rbcL* hybridisiert (Abb. 3.3-1). In den Fraktionen mit niedrig konzentrierter Saccharoselösung war wenig Transkript zu finden. Die Transkriptmenge nahm mit steigender Saccharose-Konzentration zu. In den letzten drei Fraktionen nahm die Transkriptmenge jedoch wieder ab. Im Falle einer geringeren Anlagerung von Polysomen an die mRNA sollte eine Anreicherung von Transkripten in Fraktionen mit niedriger Saccharose-Konzentration zu finden sein. Beim Vergleich der

*pam71-1* Proben zum WT sind keinerlei Veränderungen bezüglich der Transkriptverteilung zu erkennen. In den letzten drei Fraktionen des WT ist eine geringere Menge an RNA und somit auch Transkript als in der *pam71-1* Mutante zu finden. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch die Aufarbeitung der einzelnen Proben und gilt für die getesteten Transkripte *psbA*, *psbC* und *rbcL*. Auf Grund dieses Ergebnisses kann ein Defekt in der Translation der entsprechenden mRNA ausgeschlossen werden.

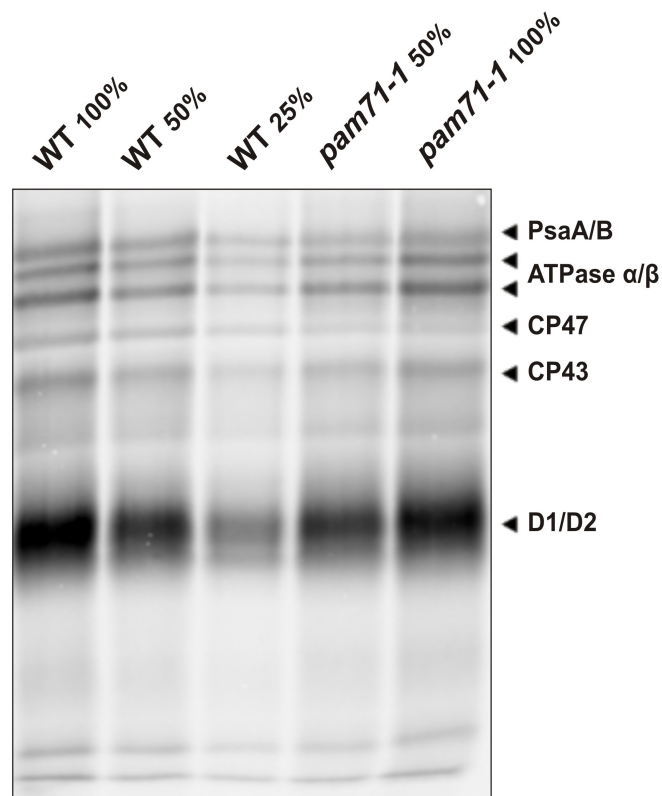


**Abbildung 3.3-1:** Analyse der mit Polysomen assoziierten mRNA in WT und *pam71-1*

Zerkleinertes Pflanzenmaterial wurde mittels Saccharose-Stufengradienten (Sucrose w/v) nach seiner Dichte aufgetrennt und der Saccharose-Stufengradient anschließend fraktioniert. Nach dem Isolieren von RNA aus den Fraktionen wurde diese in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend mittels Northern Blot auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zur Analyse der Transkripte von *psbA*, *psbC* und *rbcL* kamen die  $^{32}\text{P}$ -markierten Fragmente von *psbA*, *psbC* und *rbcL* zum Einsatz. Als Ladekontrolle diente die Färbung mit Methylenblau (M.B.).

### 3.4 Proteinbiosynthese

Um einen Defekt in der Proteinbiosynthese plastidärkodierter Proteine auszuschließen, wurde ein *in vivo* Labelling Experiment (Abb. 3.4-1) durchgeführt. Drei Wochen alte Blätter von WT und *pam71-1* Pflanzen wurden in Anwesenheit von Cycloheximid, welches der Hemmung der Synthese kernkodierter Proteine diene, für eine Stunde in Gegenwart von radioaktiv markiertem  $^{35}\text{S}$ -Methionin bei  $100\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$  inkubiert. Nach dem Auftrennen der anschließend isolierten Thylakoidmembran-Proteine mittels SDS-PAGE konnten die neu synthetisierten, radioaktiv markierten Proteine detektiert werden. Die mit dieser Methode detektierbaren Proteine, PsaA/B, ATPase  $\alpha/\beta$ , CP47, CP43 und D1/2 sind sowohl im WT als auch in der *pam71-1* Mutante klar ersichtlich. Daraus lässt sich folgern, dass die Proteinbiosynthese der *pam71-1* Mutante funktionsfähig ist.



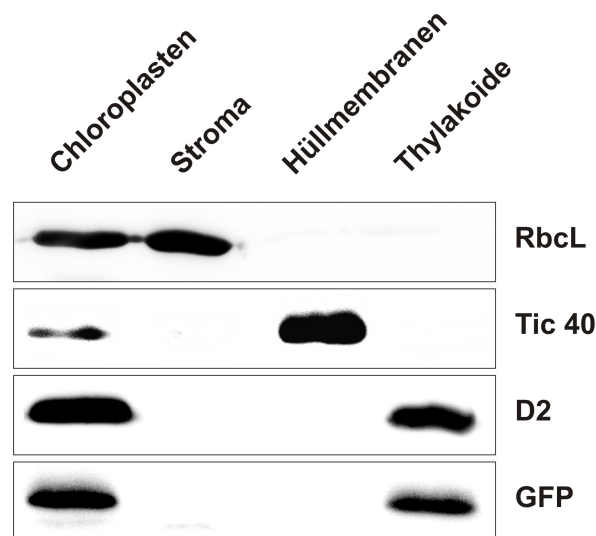
**Abbildung 3.4-1:** *In vivo* Synthese plastidärkodierter Proteine der Thylakoidmembran

Neu synthetisierte Proteine wurden während einer einstündigen Inkubation von WT und *pam71-1* Blättern unter Normallicht ( $100\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von Cycloheximid radioaktiv mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Anschließend wurden die isolierten Thylakoide mittels SDS-PAGE aufgetrennt und via Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Mit Hilfe eines radioaktiv-sensitiven Films konnten die Signale detektiert werden. Die Lademenge von 100% entsprach 200.000cpm radioaktiv markierter Thylakoidmembran-Proteine.

### 3.5 Lokalisation von PAM71 in der Thylakoidmembran

Laut Berechnungen der Computerprogramme ChloroP (Emanuelsson et al., 1999), iPSort (Bannai et al., 2002) und Multilock (Höglund et al., 2006) ist PAM71 im Chloroplasten lokalisiert. Die Webseite [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) gibt zusätzlich eine Membran im Chloroplasten als Aufenthaltsort des PAM71 Proteins an. Da unklar ist, ob es sich um die Thylakoidmembran oder die Hüllmembran von Chloroplasten handelt, wurde eine Fraktionierung von *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> Chloroplasten durchgeführt. Hierfür wurden Chloroplasten isoliert und osmotisch aufgebrochen. Die Auftrennung des Stromas, der Hüllmembranen und der Thylakoidmembran erfolgte während einer Ultrazentrifugation. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und

anschließend immunodetektiert. Um Verunreinigungen der Stromafraktion mit den zwei anderen Fraktionen auszuschließen, wurde der RubisCO-Antikörper (RbcL), der die große Untereinheit von RubisCO im Stroma detektiert, verwendet. Als weitere Kontrollen dienten der Tic40-Antikörper und der D2-Antikörper. Der Tic40-Antikörper erkennt das Tic40 Protein in der Hüllmembran des Chloroplasten und der D2-Antikörper das D2 Protein in der Thylakoidmembran. Das an PAM71-fusionierte GFP konnte eindeutig in der Thylakoidmembran detektiert werden (Abb. 3.5-1).



**Abbildung 3.5-1:** Lokalisation von PAM71-GFP

Nach der Fraktionierung von *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> Chloroplasten in Stroma, Hüllmembranen und Thylakoide (Thylakoidmembran) mit Hilfe eines Saccharose-Gradienten, wurde das PAM71-GFP Fusionsprotein mittels GFP-Antikörper detektiert. Als Kontrolle für Proteine des Stromas, der Hüllmembranen und der Thylakoide kamen die Antikörper gegen RbcL, Tic40 und D2 zum Einsatz.

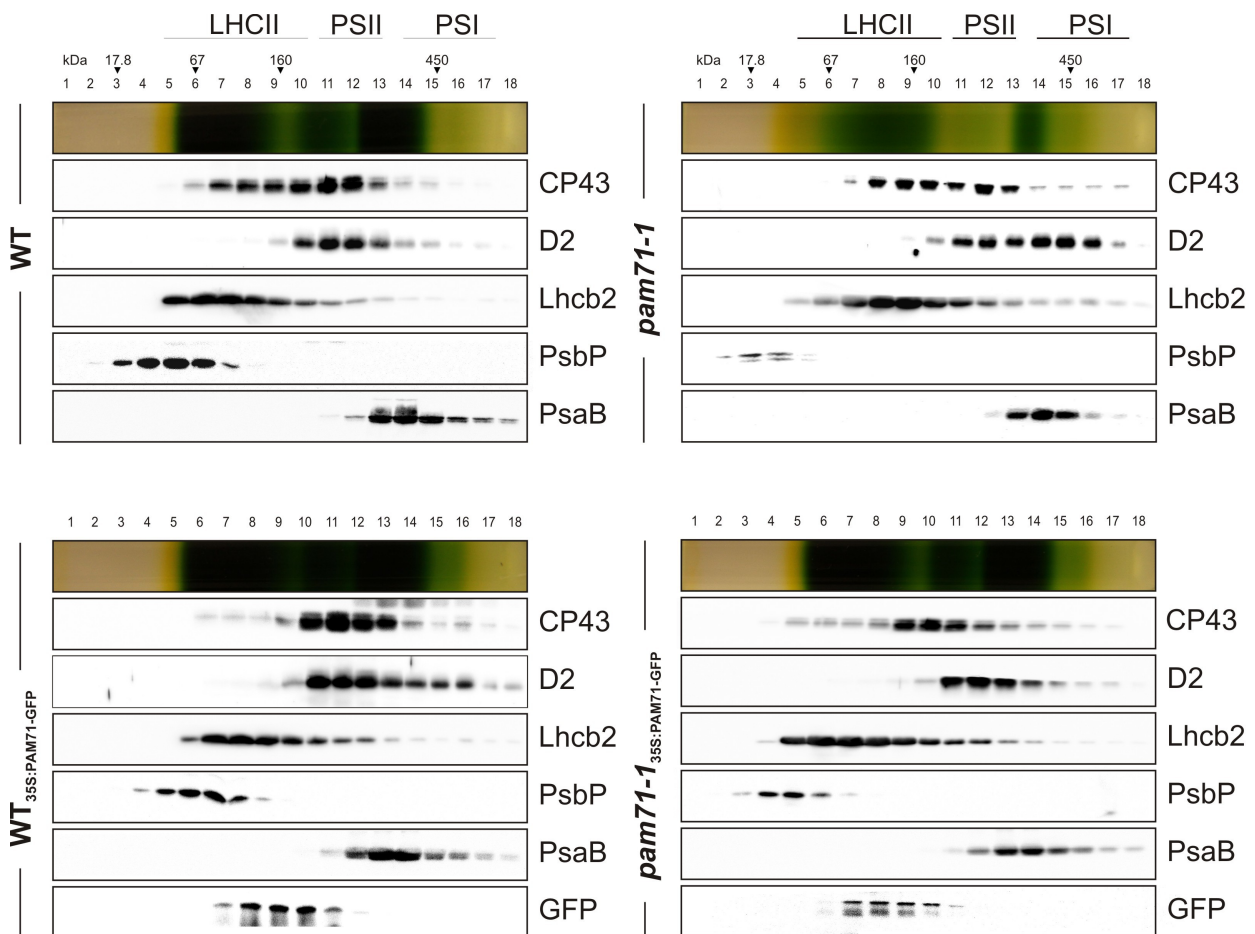
### 3.6 Saccharose-Gradienten-Zentrifugation von Proteinkomplexen

Da PAM71 nachweislich in der Thylakoidmembran lokalisiert ist, war es von Interesse, eine mögliche Co-Lokalisation mit einem der photosynthetischen Superkomplexe zu ermitteln. Es wurden Thylakoide von WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1* und *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> isoliert. Zum Auftrennen der Protein-Superkomplexe wurden die mit 1%  $\beta$ -DM solubilisierten Thylakoidmembran-Komplexe auf einen Saccharose-Gradienten geladen und mittels Ultrazentrifugation separiert. Daraufhin wurde der Saccharose-Gradient in 18 Fraktionen aufgeteilt. Die in den Fraktionen enthaltenen



Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Anschließend konnten einzelne Proteine immunodetektiert werden.

Die Abbildung 3.6-1 mit den intakten Saccharose-Gradienten aller vier Pflanzenlinien lässt die drei Superkomplexe, LHCII, PSII und PSI erkennen. Zur Verifizierung der Komplexe wurden verschiedene Markerproteine gewählt. Um PSII den jeweiligen Fraktionen des Saccharose-Gradienten vom WT zuordnen zu können, wurden Antikörper gegen die Proteine CP43 und D2 gewählt, die in den Fraktionen 6 bis 15 bzw. in den Fraktionen 9 bis 16 zu finden waren. Als Vertreter für die LHCII wurde der Antikörper gegen das Lhcb2 Protein verwendet. Dieses wurde in den Fraktionen 5 bis 15 detektiert. Als Nachweis des PSI-Komplexes wurde der PsaB-Antikörper verwendet; er erkannte das PsaB Protein in den Fraktionen 12 bis 18. Als Kontrolle für Proteine, die sich während des Solubilisierens von den Superkomplexen abgelöst hatten und somit von vornherein nur lose an die Komplexe gebunden waren, wurde der PsbP-Antikörper gewählt. Das Protein PsbP war in den Fraktionen 3 bis 7 vorhanden. In den Fraktionen der Saccharose-Gradienten von WT<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1* und *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> war jeweils die gleiche Proteinverteilung zu finden. Teilweise waren die Verteilungen der Signale um eine Fraktion verschoben, was im Rahmen der methodischen Abweichung lag. Die Proteinverteilung ist in Tabelle 3.6-1 angegeben. Von größtem Interesse war die Detektion des GFP-Antikörpers, welcher Aufschluss über die Lokalisation des PAM71-GFP Proteins gibt. Das PAM71-GFP Protein wurde in den Fraktionen 6 bis 11 detektiert. In diesen Fraktionen sind Proteine zu finden, die eine Größe von 70 kDa bis 200 kDa aufweisen. Da PAM71-GFP eine Größe von ca. 70 kDa besitzt, liegt der Schluss nahe, dass PAM71-GFP eventuell als Dimer von 140 kDa oder in einem kleinen Komplex vorliegen könnte. Eine Lokalisation mit einem der Superkomplexe LHCII, PSI oder PSII kann also ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.6-1:** Analyse von LHCII, PSII und PSI mittels Saccharose-Gradient von WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1* und *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>

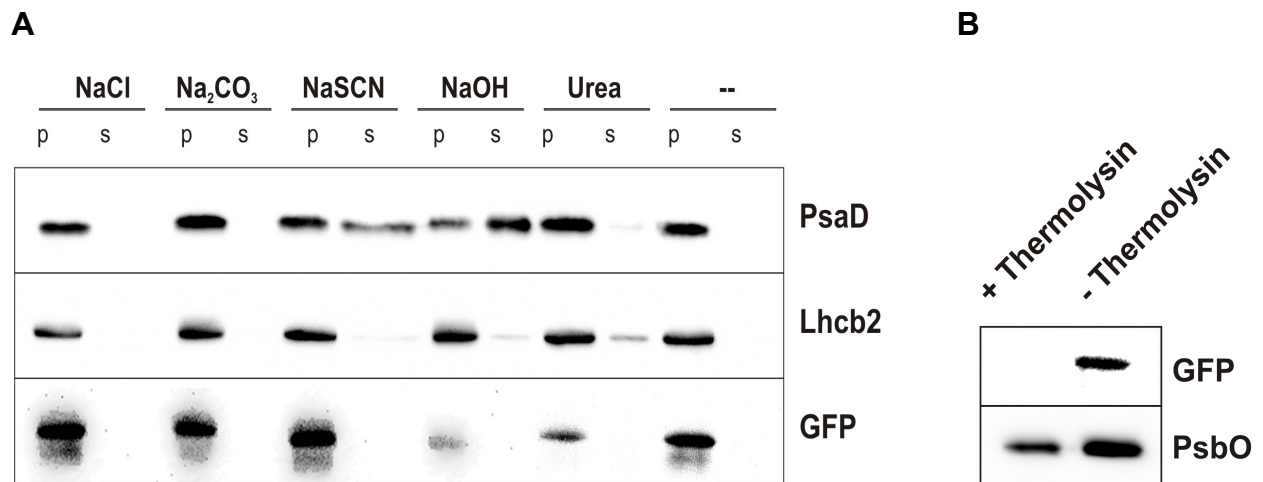
Thylakoidmembran-Komplexe von WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1* und *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> wurden nach dem Solubilisieren mit 1%  $\beta$ -DM, mittels Saccharose-Gradient in LHCII, PSII und PSI Superkomplexe separiert und via SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Analyse der Superkomplexe wurden Immunoblots durchgeführt. Hierbei wurden Antikörper gegen die Proteine CP43 und D2 (PSII), Lhcb2 (LHCII), PsbP (lösliche Proteine) und PsaB (PSI) genutzt. Das PAM71-GFP Fusionsprotein wurde mit dem GFP-Antikörper detektiert.

**Tabelle 3.6-1:** Verteilung von Thylakoidmembran-Proteinen in Fraktionen des Saccharose-Gradienten

Protein	Fraktionen WT	Fraktionen WT <sub>35S:PAM71-GFP</sub>	Fraktionen <i>pam71-1</i>	Fraktionen <i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub>
CP43	6-15	6-17	6-17	6-18
D2	9-16	8-18	9-17	9-18
Lhcb2	5-15	5-18	4-18	4-18
PsbP	3-7	3-8	2-5	3-7
PsaB	12-18	11-18	11-17	11-18
GFP		6-11		6-10

### 3.7 Topologie-Studie von PAM71

In der Aramemnon-Datenbank ist PAM71 als ein integrales Membranprotein mit durchschnittlich sieben Membranspannen verzeichnet. Um die Verankerung in der Thylakoidmembran zu überprüfen, wurden *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> Thylakoidmembranen mit verschiedenen chaotropen salzhaltigen Lösungen und alkalischen Lösungen gewaschen. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Thylakoidpellets sowie die Überstände wurden mittels Western Blot Analysen untersucht (Abb. 3.7-1A) und lieferten Informationen über die Integrität des Proteins in der Thylakoidmembran (Karnauchov et al., 1997). Proteine wie PsaD, die nur locker in der Thylakoidmembran eingebettet sind, wurden mit NaSCN und NaOH herausgelöst. Integrale Membranproteine wie Lhcb2 konnten durch diese Waschungen nicht aus der Membran gelöst werden und sind somit fest in der Thylakoidmembran verankert. Das PAM71-GFP Protein wurde stets im Thylakoidpellet detektiert und zeigt deshalb das Verhalten eines integralen Membranproteins. Damit wurde die bioinformatische Voraussage der Aramemnon-Datenbank, dass PAM71 ein in die Thylakoidmembran verankertes Protein ist, bestätigt.



**Abbildung 3.7-1:** Salzwaschung und Thermolysin-Verdau von intakten Thylakoiden von *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup>

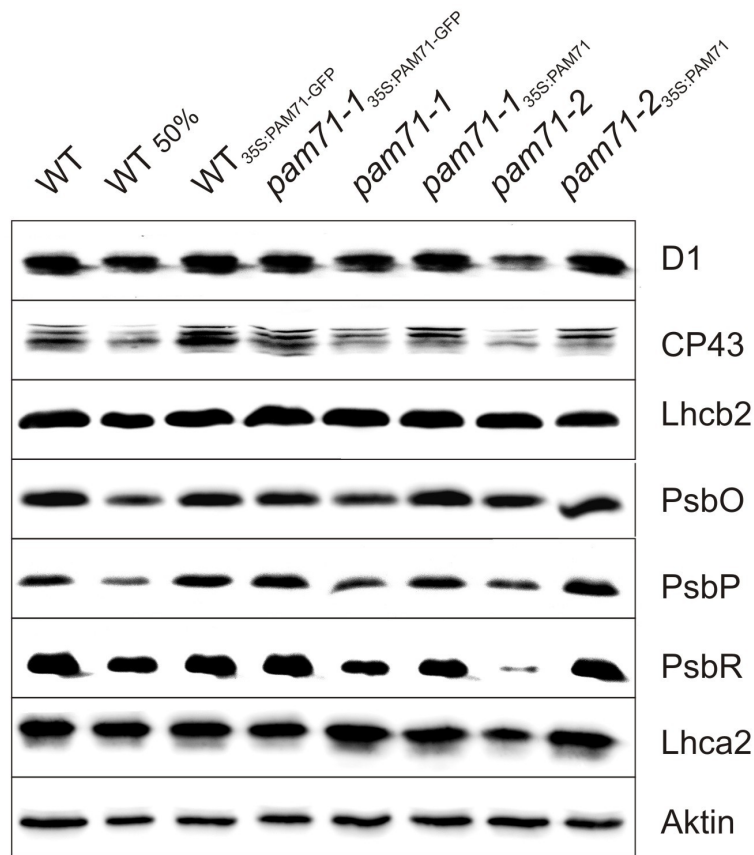
A: Salzwaschung von *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> Thylakoidmembranen. Der GFP-Antikörper wurde zur Detektion des PAM71-GFP fusionierten Proteins entweder im Pellet oder im Überstand nach der Salzwaschung verwendet. Als Kontrollen wurden Antikörper gegen Lhcb2 als integrales Membranprotein und PsaD als extrinsisches Membranprotein eingesetzt. p: Pellet, s: Überstand

B: Thermolysin-Verdau von *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> Thylakoiden. Zum Detektieren des C-terminalen Parts von PAM71-GFP wurde der GFP-Antikörper verwendet. Als Kontrolle diente das lumenale Protein PsbO.

Das GFP Protein wurde an den C-Terminus des PAM71 Proteins fusioniert. Der vorhandene GFP-Tag ermöglichte daher Experimente zur Untersuchung der Orientierung des C-Terminus zur stromalen Seite der Thylakoidmembran oder zur lumenalen Seite der Membran. Dazu wurden Thylakoide von *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> Pflanzen mit Thermolysin behandelt. Die auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran lokalisierten Proteine konnten durch das Thermolysin verdaut werden. Im Gegensatz dazu wurden Proteine, die sich auf der lumenalen Seite der Thylakoidmembran befanden, durch die Thylakoidmembran geschützt und nicht durch Thermolysin abgebaut. Ein GFP-Signal (Abb. 3.7-1B) konnte nur in der unbehandelten Probe detektiert werden. Das bedeutet, dass das Thermolysin den zur stromalen Seite der Thylakoidmembran orientierten GFP-Tag abbaut. PsbO, ein lumenal orientiertes Protein, konnte in der mit Thermolysin behandelten und unbehandelten Probe detektiert werden. Hierbei wird sichtbar, dass die Thylakoidmembran tatsächlich eine Barriere für das Thermolysin darstellt und deshalb geschützte Proteine nur minimal verdauen kann. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass der GFP-Tag und damit der C-Terminus von PAM71 zur stromalen Seite der Thylakoidmembran orientiert ist.

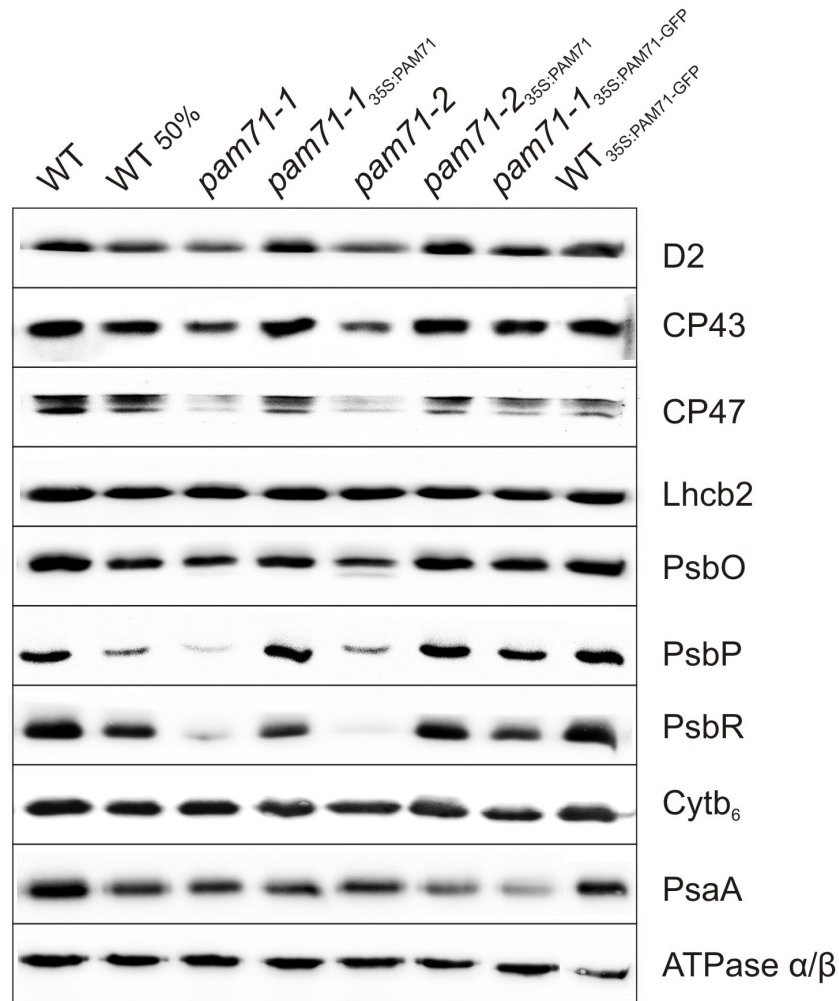
### 3.8 Analyse chloroplastidärer Membranproteinkomplexe mittels Western Blot

Da die *pam71-1* und *pam71-2* Mutanten ein stark verlangsamtes Wachstum aufwiesen und das PAM71 Protein nachweislich in der Thylakoidmembran lokalisiert war, wurden die in den Chloroplasten lokalisierten Proteine der Photosynthese-Komplexe mittels Immunodetektion analysiert. Hierzu wurde Gesamtprotein entsprechend gleicher Mengen Frischgewicht von vier Wochen alten Pflanzen von WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub>, *pam71-2* und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> isoliert (Abb. 3.8-1). In einem zweiten Ansatz wurden Thylakoidmembran-Proteine entsprechend gleicher Mengen Frischgewicht der sieben Linien gewonnen (Abb. 3.8-2). Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern gegen Untereinheiten des PSI, PSII, LHCI, LHCII, Cytochrom *b<sub>6</sub>/f* Komplexes und der ATPase detektiert. Der Antikörper gegen Aktin, welcher das Aktin-Protein, ein in der Zelle vorkommendes Strukturprotein des Zytoskeletts, erkennt, diente als Ladekontrolle.



**Abbildung 3.8-1:** Protein-Gehalt von Pflanzen der Linien WT, WT<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*, *pam71-1*<sup>35S:PAM71</sup>, *pam71-2* und *pam71-2*<sup>35S:PAM71</sup> Gesamtprotein (10mg Frischgewicht) von WT, WT<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*, *pam71-1*<sup>35S:PAM71</sup>, *pam71-2* und *pam71-2*<sup>35S:PAM71</sup> wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Hilfe von Immunodetektion analysiert. Es wurden Antikörper gegen PSII, LHCII, LHCI und Aktin angewandt.

Die Western Blot Analysen bezogen auf das Gesamtprotein zeigten, dass die Proteinmengen von D1, CP43 sowie PsbO, PsbP und PsbR in der *pam71-1* und *pam71-2* Mutante reduziert sind. Untereinheiten von LHCII und LHCI in *pam71-2* sowie Aktin sind nicht beeinträchtigt. Deutlicher zu beobachten waren die reduzierten Proteinmengen in *pam71-1* und *pam71-2* in Western Blot Analysen bezogen auf Thylakoidmembran-Proteine.



**Abbildung 3.8-2:** Protein-Gehalt von Pflanzen der Linien WT, *pam71-1*, *pam71-1*<sup>35S:PAM71</sup>, *pam71-2*, *pam71-2*<sup>35S:PAM71</sup>, *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> und WT<sup>35S:PAM71-GFP</sup>

Nach Frischgewicht normierte Thylakoide von WT, *pam71-1*, *pam71-1*<sup>35S:PAM71</sup>, *pam71-2*, *pam71-2*<sup>35S:PAM71</sup>, *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup> und WT<sup>35S:PAM71-GFP</sup> wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe verschiedener Antikörper analysiert. Es wurden Untereinheiten von PSII, LHCII, Cytochrom b<sub>6</sub>/f, PSI und der ATPase untersucht. 100% entsprechen 5µg Chl a+b.

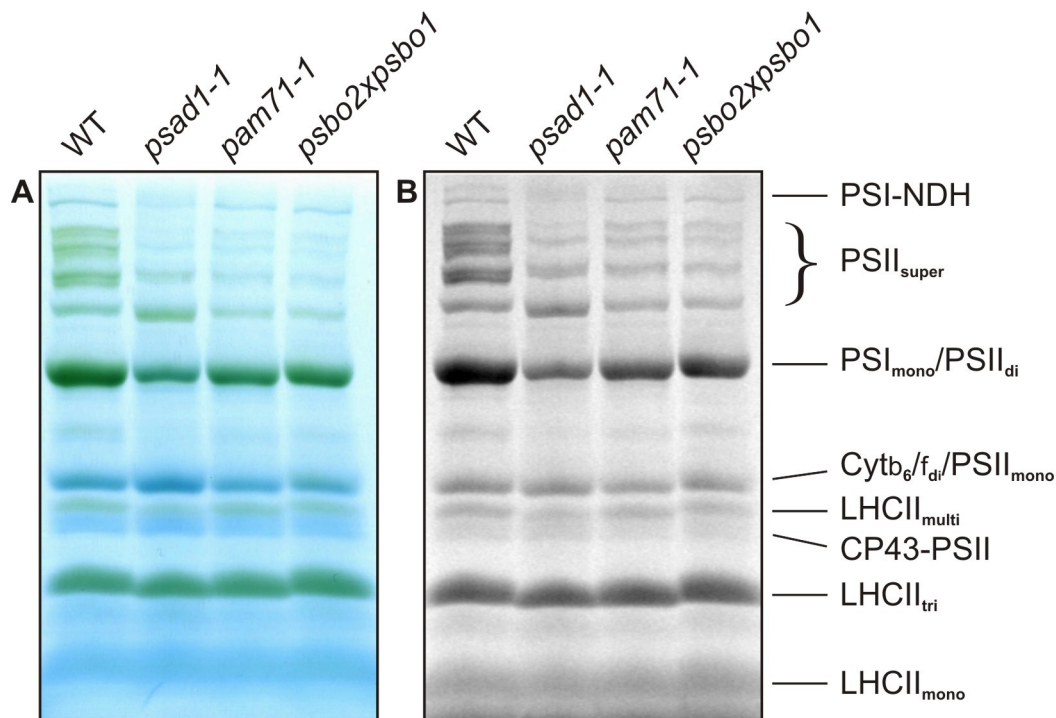
In Abbildung 3.8-2 ist die reduzierte Proteinmenge der PSII Untereinheiten D2, CP43 und CP47 sowie PsbO, PsbP und PsbR in den *pam71-1* und *pam71-2* Mutanten deutlich zu sehen. Ebenfalls reduziert war die Untereinheit PsaA des PSI, während bei Untereinheiten von LHCII, des Cytochrom b<sub>6</sub>/f Komplexes und der ATPase kein wesentlicher Unterschied zum WT erkennbar war. Hieraus lässt sich folgern, dass die *pam71* Mutanten einen spezifischen Defekt im PSII aufweisen. Auf Grund der

reduzierten Untereinheit PsaA des PSI kann ein Defekt im PSI nicht ausgeschlossen werden.

### 3.9 Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Zur Untersuchung der Thylakoid-Multi-Proteinkomplexe wurden BN-PAGE-Analysen mit WT, *pam71-1* und als Vergleichsproben mit einer im PSI defekten Mutante, *psad1-1*, sowie einer im PSII defekten Mutante, *psbo2xpsbo1*, durchgeführt. Dabei wurden die Multi-Proteinkomplexe nach dem Solubilisieren mit Hilfe von 1%  $\beta$ -DM nativ in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 3.9-1). Die Proteinkomplexe PSI-ND(P)H-Dehydrogenase (PSI-NDH), PSII-Superkomplexe (PSII<sub>super</sub>), PSI-Monomer / PSII-Dimer (PSI<sub>mono</sub>/PSII<sub>di</sub>), Cytochrom  $b_6/f$ -Dimer / PSII-Monomer (Cytb<sub>6</sub>/f<sub>di</sub>/PSII<sub>mono</sub>), LHCII-Multimer (LHCII<sub>multi</sub>), PSII ohne CP43 (CP43-PSII), LHCII-Trimer (LHCII<sub>tri</sub>) und LHCII-Monomer (LHCII<sub>mono</sub>) nach Armbruster et al., 2010 waren in allen Pflanzenlinien vorhanden. Wie bereits beschrieben (Ihnatowicz et al., 2004) wies die *psad1-1* Mutante einen stark reduzierten PSI-NDH Komplex sowie reduzierte PSII-Superkomplexe und PSI<sub>mono</sub>/PSII<sub>di</sub> Komplexe im Vergleich zum WT auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der *pam71-1* und *psbo2xpsbo1* Mutante eine reduzierte Anzahl PSII-Superkomplexe sowie PSI<sub>mono</sub>/PSII<sub>di</sub> Komplexe und leicht reduzierte Level der Cytb<sub>6</sub>/f<sub>di</sub>/PSII<sub>mono</sub> Komplexe.



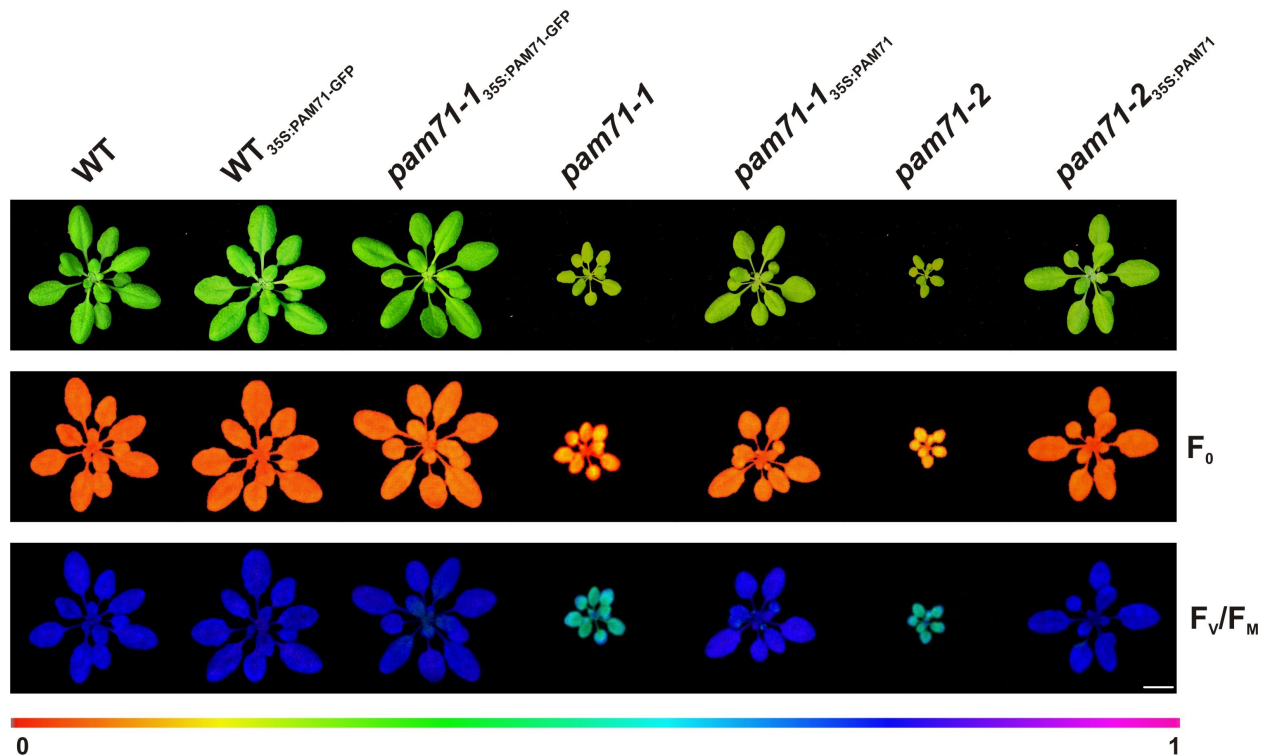


**Abbildung 3.9-1:** BN-PAGE von WT, *psad1-1*, *pam71-1* und *psbo2xpsbo1*

Thylakoide (20µg Chl a+b) wurden mit 1%  $\beta$ -DM solubilisiert und die Multi-Proteinkomplexe mittels BN-PAGE aufgetrennt. A: Foto der BN-PAGE; B: Typhoon Scan der BN-PAGE: angeregt durch einen roten Laser-Puls (633nm), anschließend ohne Emissionsfilter detektiertes Signal.

### 3.10 Chlorophyll a Fluoreszenz-Messungen und P700-Absorptionsmessungen

Um einen Überblick über die Funktionalität und Effektivität der Photosynthese in den verschiedenen Pflanzen zu gewinnen, wurden Chlorophyll a Fluoreszenz-Messungen an intakten Blättern durchgeführt. Für eine erste Orientierung der Photosynthese-Leistung der Pflanzen wurde die Imaging-PAM verwendet (Abb. 3.10-1). Um die maximale Ausbeute des PSII zu ermitteln, wurde  $F_v/F_m$  bestimmt. Dabei entspricht eine Orangefärbung dem  $F_v/F_m$  Wert 0 und violett dem  $F_v/F_m$  Wert 1. Eine wildtypische Pflanze mit einer maximalen Ausbeute des PSII besitzt einen  $F_v/F_m$  Wert um 0,85. Die Pflanzenlinien WT<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*<sup>35S:PAM71</sup> und *pam71-2*<sup>35S:PAM71</sup> zeigten alle die Intaktheit von PSII an. Einzig die Mutanten *pam71-1* und *pam71-2* wiesen einen  $F_v/F_m$  Wert von 0,6 bis 0,7 auf. Das bedeutet, dass die maximale Ausbeute des PSII vermindert ist.



**Abbildung 3.10-1:** Photosynthese-Leistung der Pflanzenlinien (Imaging-PAM)

Intakte Blätter von WT, WT<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*<sup>35S:PAM71-GFP</sup>, *pam71-1*, *pam71-1*<sup>35S:PAM71</sup>, *pam71-2* und *pam71-2*<sup>35S:PAM71</sup> wurden mittels Imaging-PAM auf ihre Photosynthese-Leistung überprüft. Dargestellt ist ein Foto der Pflanzen und die farblich dargestellten Werte der Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) und der maximalen Ausbeute des PSII ( $F_v/F_m$ ). Der weiße Balken entspricht 1,5cm.

Um die Chlorophyll a Fluoreszenz-Messung an der Dual-PAM korrekt ausführen zu können, musste das Plastochinon ( $Q_A$ ) maximal oxidiert sein. Für diesen Schritt der Vorbereitung wurden die Pflanzen für mindestens 30 Minuten im Dunkeln adaptiert. Im Zustand des oxidierten  $Q_A$  wird das PSII-Reaktionszentrum als „offen“ bezeichnet. Im offenen Zustand des PSII-Reaktionszentrums kann  $Q_A$  reduziert werden. Die Bestrahlung der dunkel adaptierten Blätter mit einem sehr schwach dosierten ( $0,1 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) Messlicht-Strahl induzierte die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ). Damit  $Q_A$  im oxidierten Zustand verbleibt, darf das Messlicht kein aktinisches Licht enthalten, stattdessen muss schwaches Messlicht, welches speziell PSI anregt, appliziert werden. So wurden verbliebene Elektronen vom  $Q_A$  zum PSI abgezogen. Anschließend wurden die Blätter mit einem kurzen, aber sehr starken Licht-Puls bestrahlt. Dabei wurde  $Q_A$  maximal reduziert und gleichzeitig die maximale Fluoreszenz ( $F_M$ ) ermittelt. Das maximal reduzierte  $Q_A$  enthaltende PSII-Reaktionszentrum wurde daraufhin als

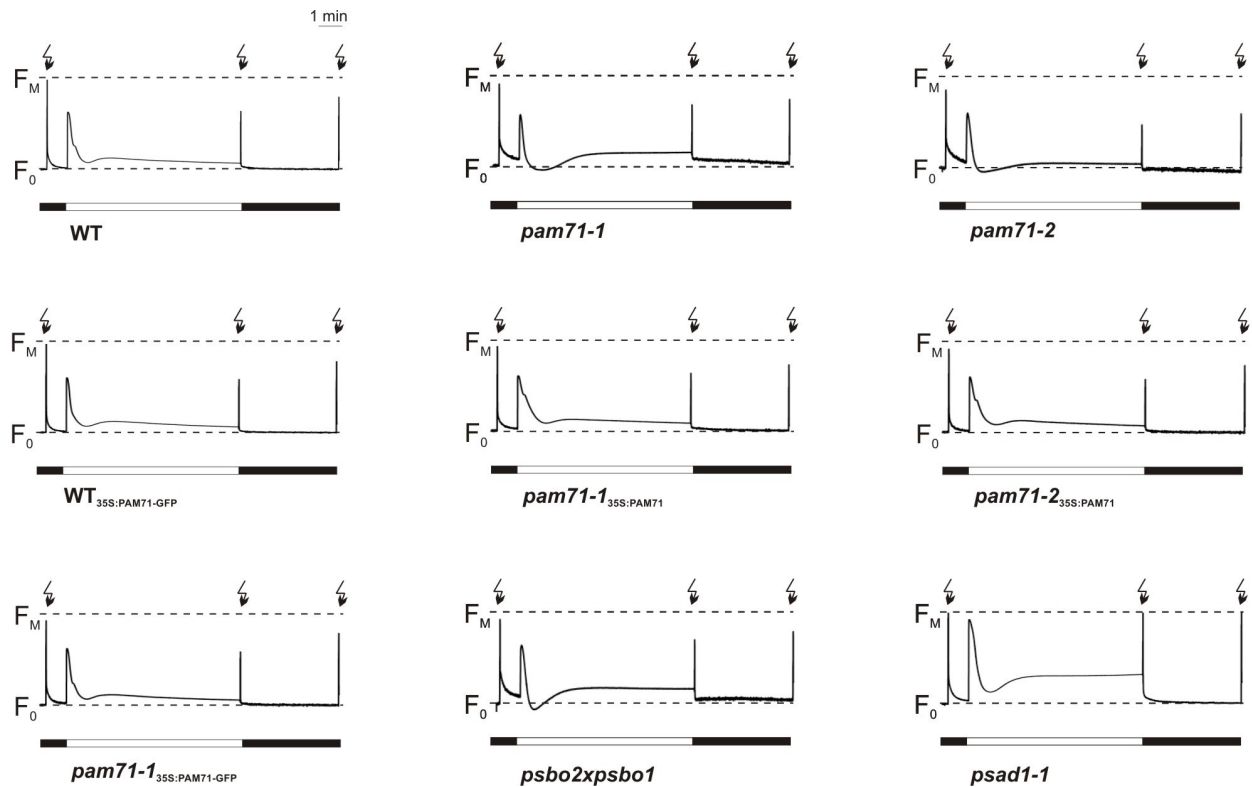
„geschlossen“ bezeichnet. Die Differenz zwischen  $F_M$  und  $F_0$  wird als variable Fluoreszenz ( $F_V$ ) benannt. Das Verhältnis von  $F_V/F_M$  kann zur Einschätzung der maximalen Ausbeute der  $Q_A$ -Reduktion, das heißt, zur Einschätzung der Photochemie von PSII verwendet werden (Review-Artikel: Baker, 2008). Anschließend wurden die Blätter mit aktinischem Licht bestrahlt, was einen Anstieg der Fluoreszenz zur Folge hatte. In den nächsten Minuten sank die Fluoreszenz ab. Dieses Phänomen, welches Fluoreszenz-Auslöschung genannt wird, kann folgendermaßen erklärt werden. Beim Anstieg der Fluoreszenz werden Elektronen vom PSII abtransportiert; es werden Enzyme aktiviert, die im Calvin-Zyklus eine Rolle spielen, und die Stomata öffneten sich. Zur selben Zeit wird überschüssige Energie in Wärme umgewandelt (NPQ). Während der nächsten 15-20 Minuten stabilisieren sich diese Prozesse und es wurde ein konstantes Fluoreszenz-Level erreicht (Review-Artikel: Maxwell und Johnson, 2000).

In Tabelle 3.10-1 sind die gemessenen  $F_V/F_M$  Werte und die effektive Ausbeute des PSII ( $\Phi_{II}$ : Vergleiche 2.2.22) dargestellt. Wie erwartet hatten WT sowie  $WT_{35S:PAM71-GFP}$ , *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub>  $F_V/F_M$  Werte zwischen 0,83 und 0,86 und zeigten damit eine funktionelle Komplementation an. Die  $F_V/F_M$  Werte von *pam71-1* und *pam71-2* betrugen 0,68 bzw. 0,67 und bestätigten die vorangegangene Beobachtung an der Imaging-PAM. Die *psad1-1* Mutante diente der Kontrolle von im PSI defekten Pflanzen und wies einen  $F_V/F_M$  Wert von 0,83 auf. Im Gegensatz dazu zeigte die im PSII defekte Mutante *psbo2xpsbo1* einen  $F_V/F_M$  Wert von 0,61. Der  $\Phi_{II}$  Wert von WT,  $WT_{35S:PAM71-GFP}$ , *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> lag zwischen 0,70 und 0,74, während *pam71-1* bzw. *pam71-2*  $\Phi_{II}$  Werte von 0,48 und 0,49 aufwiesen. Die zur Kontrolle gemessenen Mutanten *psad1-1* und *psbo2xpsbo1* ließen beide reduzierte  $\Phi_{II}$  Werte von 0,57 bzw. 0,55 erkennen.

**Tabelle 3.10-1:** Mittels Dual-PAM ermittelte  $F_v/F_m$  und  $\Phi_{II}$  Werte

Pflanzenlinie	$F_v/F_m$	$\Phi_{II}$
<b>WT</b>	$0,87 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,01$
<b>WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub></b>	$0,86 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,01$
<b><i>pam71-1</i><sub>35S:PAM71-GFP</sub></b>	$0,83 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,02$
<b><i>pam71-1</i></b>	$0,68 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,02$
<b><i>pam71-1</i><sub>35S:PAM71</sub></b>	$0,84 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$
<b><i>pam71-2</i></b>	$0,67 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,04$
<b><i>pam71-2</i><sub>35S:PAM71</sub></b>	$0,84 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$
<b><i>psbo2xpsbo1</i></b>	$0,61 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,03$
<b><i>psad1-1</i></b>	$0,83 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,04$

In Abbildung 3.10-2 sind die Chlorophyll a Fluoreszenzkurven aller Pflanzenlinien dargestellt. Die typische WT-Kurve spiegelte sich in den Linien WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> wider. Die Kurven von *pam71-1* und *pam71-2* zeigten nach dem Einschalten des aktinischen Lichts zunächst den typischen Fluoreszenz-„Peak“, sanken dann aber unter die Grundfluoreszenz ab. Dieses Absinken der Fluoreszenz war in der *psbo2xpsbo1* Mutante ebenfalls zu beobachten und deutet auf eine durch das Messlicht induzierte „falsch“ gemessene Grundfluoreszenz hin. Zur Kontrolle wurde *psad1-1*, eine im PSI defekte Mutante, hinzugezogen. Diese zeigte eine deutlich höhere Chlorophyll a Fluoreszenz während der Phase des aktinischen Lichts ohne vorheriges Absinken unter die Grundfluoreszenz. Auf Grund der vergleichenden Analysen des Fluoreszenzverlaufs der *pam71* Mutanten mit der *psbo2xpsbo1* Mutante lag der Schluss nahe, dass *pam71-1* und *pam71-2* Mutanten mit einem spezifischen Defekt im PSII sind.



**Abbildung 3.10-2:** Messung der Chlorophyll a Fluoreszenz der Pflanzenlinien (Dual-PAM)

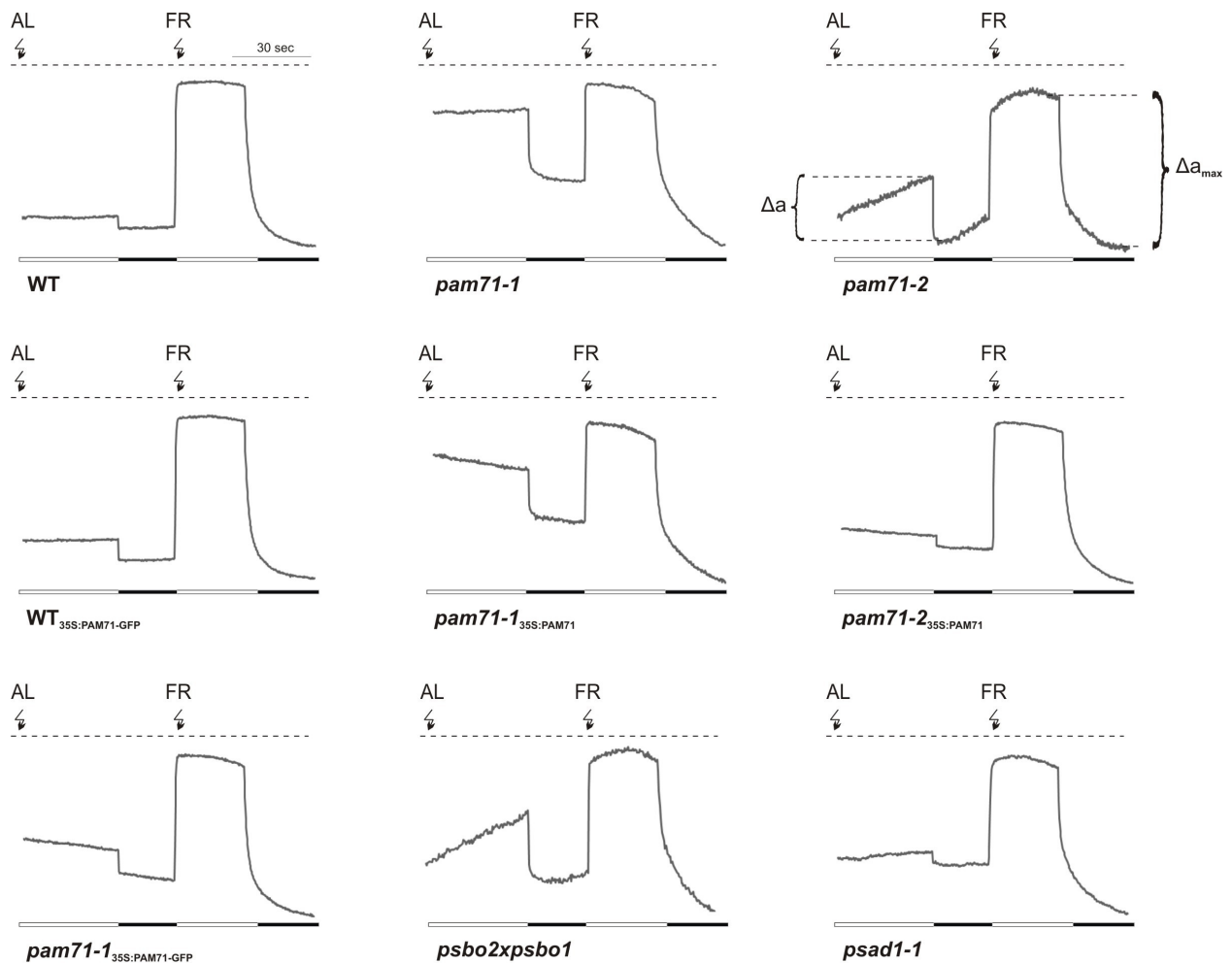
*In vivo* Chlorophyll a Fluoreszenz-Messung mittels Dual-PAM von WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub>, *pam71-2* und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub>, sowie den Kontrollen *psbo2xpsbo1* und *psad1-1*.

Um zu bestätigen, dass es sich bei den *pam71* Mutanten tatsächlich um im PSII defekte Mutanten handelt, sollte die Funktionalität von PSI untersucht werden. Hierzu wurden P700 Absorptionsmessungen durchgeführt.

P700 Absorptionsmessungen geben Aufschluss über den funktionellen Zustand von in der Elektronentransportkette PSII nachfolgenden Proteinkomplexen. Hierbei wurde die Redox-Kinetik des PSI (P700 Absorption) mittels Dual-PAM *in vivo* an *A. thaliana* Blättern gemessen. Nachdem P700 mit Hilfe von aktinischem Licht reduziert worden war, wurde es anschließend mit dunkelrotem Licht oxidiert. Mit Hilfe der gemessenen Graphen konnte sowohl  $\Delta a$  wie auch  $\Delta a_{\max}$  (vergleiche Abb. 3.10-3) ermittelt werden. Der aus diesen Daten ermittelte Quotient  $\Delta a / \Delta a_{\max}$  und die wiederum aus  $\Delta a / \Delta a_{\max}$  gewonnenen Daten  $1 - \Delta a / \Delta a_{\max}$  ( $\Phi_I$ ) gaben ebenfalls Auskunft über einen möglichen Defekt im PSI oder anderen Proteinkomplexen.

Die P700-Absorptionskurven der 9 Pflanzenlinien sind in Abbildung 3.10-3 dargestellt und die zugehörigen  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werte in Tabelle 3.10-2 aufgeführt. Hierbei erzielten wildtypische Pflanzen  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werte um 0,12. Werte, die im Vergleich zum WT  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Wert erhöht waren, wiesen darauf hin, dass kein Defekt im PSI bestand, sondern einzig ein Defekt im PSII vorlagen. Waren die  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werte niedriger als der WT-Wert, konnte von einem Defekt im PSI ausgegangen werden.

WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, und *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub> zeigten  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werte zwischen 0,11-0,13, während die  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werte von *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> mit 0,17 bzw. 0,14 leicht erhöht waren. Dies ließ darauf schließen, dass diese Mutanten nicht zu 100% komplementiert waren. Die Mutanten *pam71-1* und *pam71-2* hatten  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werte von 0,35 und 0,20 und *psbo2xpsbo1* einen  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Wert von 0,24. Bei diesen Mutanten konnte davon ausgegangen werden, dass ein alleiniger Defekt im PSII besteht. Die im PSI defekte Mutante *psad1-1* wies einen  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Wert von 0,08 auf.



**Abbildung 3.10-3:** Darstellung der photosynthetischen Leistung von PSI der 9 Pflanzenlinien

Die Redox-Kinetik von P700 wurde mittels Messung intakter Blätter von WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub>, *pam71-2*, *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> und den Kontrollen *psbo2xpsbo1* und *psad1-1* mit Hilfe des Dual-PAM Fluometers durchgeführt.

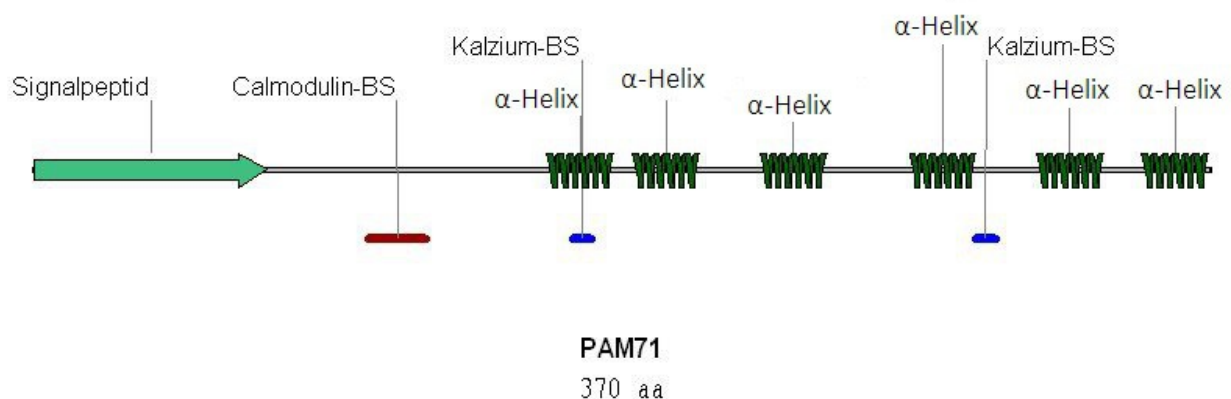
Die aus den  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werten resultierenden  $\Phi I$  Werte sind in Tabelle 3.10-2 aufgeführt. Anders als bei den  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  Werten deuteten  $\Phi I$  Werte, die im Vergleich zu WT erhöht waren, auf einen Defekt im PSI und  $\Phi I$  Werte, die im Vergleich zum WT niedriger waren, auf einen Defekt im PSII hin. Entsprechend wies die PSI Mutante *psad1-1* mit 0,92 einen hohen  $\Phi I$  Wert auf, während die PSII Mutante *psbo2xpsbo1* mit 0,76 einen niedrigen  $\Phi I$  Wert zeigte. Die  $\Phi I$  Werte von WT, WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> lagen im Bereich von 0,89 bis 0,83. Die  $\Phi I$  Werte von *pam71-1* und *pam71-2* lagen mit 0,65 und 0,80 unter dem Wert des WT und deuteten damit auf einen alleinigen Defekt im PSII hin.

**Tabelle 3.10-2:**  $\Delta a/\Delta a_{\max}$  und  $\Phi I$  Werte der P700-Absorptionskurven

Pflanzenlinie	$\Delta a/\Delta a_{\max}$	$\Phi I$
WT	$0,12 \pm 0,04$	$0,88 \pm 0,04$
WT <sub>35S:PAM71-GFP</sub>	$0,11 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,02$
<i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71-GFP</sub>	$0,13 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,03$
<i>pam71-1</i>	$0,35 \pm 0,03$	$0,65 \pm 0,03$
<i>pam71-1</i> <sub>35S:PAM71</sub>	$0,17 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,04$
<i>pam71-2</i>	$0,20 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,03$
<i>pam71-2</i> <sub>35S:PAM71</sub>	$0,14 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,03$
<i>psbo2xpsbo1</i>	$0,24 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,02$
<i>psad1-1</i>	$0,08 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,02$

### 3.11 Protein-Struktur von PAM71

Mit Hilfe der Proteinsequenz von PAM71 konnten bioinformatisch (vergleiche 2.2.24) sechs Membranspannen ( $\alpha$ -Helix) identifiziert werden. Zusätzlich besitzt PAM71 zwei mögliche Kalzium-Bindestellen, eine davon in der ersten Membranspanne und die zweite zwischen der vierten und fünften Membranspanne. Zusätzlich wird eine Calmodulin-Bindestelle vor der ersten Membranspanne vermutet (Abb. 3.11-1).

**Abbildung 3.11-1:** Darstellung der Proteinstruktur von PAM71

Dargestellt sind das Signalpeptid, die mutmaßliche Calmodulin-Bindestelle (BS), sechs Membranspannen ( $\alpha$ -Helix) und zwei möglichen Kalzium-Bindestellen (BS).

Die Analyse der Proteinsequenz von PAM71 ließ homologe Proteine in anderen Organismen erkennen. Abbildung 3.11-2 zeigt einen Abgleich der Proteinsequenz von



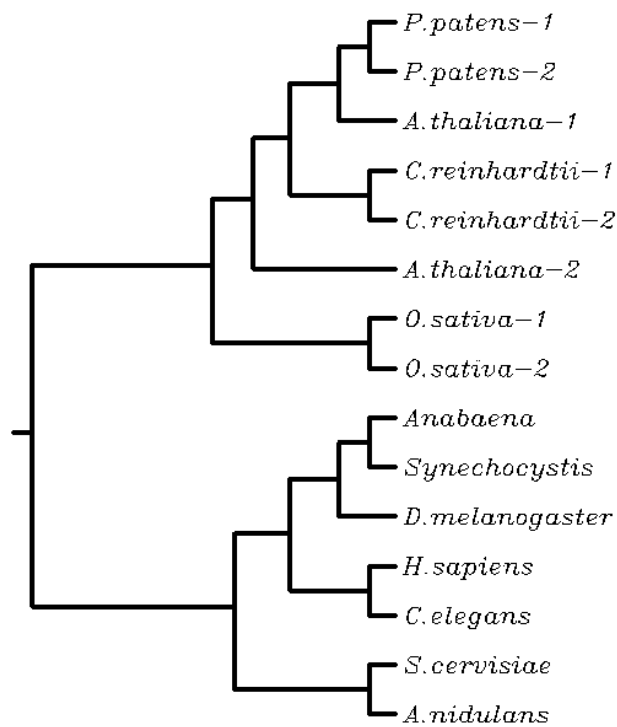
PAM71 in *A. thaliana* (Gene: *At1g64150* und *At4g13590*) mit homologen Proteinen im Mensch (TMEM165) und in Hefe (Gdt1p).

At1g64150	1	MLSLNLSESL	RIPFQNPFP	KSDFSSTSS	PSSSSRACVS	AYPIPIGFSV	RNQSFSRCLT	QLRRNESQQL	GFCFQRNDA	ACYLEKAESE	EHRNLDVLV	ESSIAHSRE	IQRVLMFLAV	SGSVALLGTD	130
At4g13590		M	KLTLSSKNAN	STATATVSS	IQKLPLSL	E-TLPCPKSS	RKPTFLPLRC	RRRPKLDLLW	GKFRVRASDA	GVGSGSYSGG	EEDGSQSSSL	DQSPATSSS	LKPRGFF-PY	SLSLIALVLLS	
TMEM165								MA	AAAPGNGRAS	AFRLLLFLV	FLWAPAAVR	AGPDEDLSHR	NKEPPAPAQQ	LQPQPVAVQG	PEPARVEKIF
Gdt1p													MGNMIKK	ASLIALLPLF	
Consensus															
At1g64150	131	PFAAASSIPN	VIQSLVTSFG	DLGDISSGFA	SAFLLIFFSE	LGDKTFFLAA	LLAARNSAAT	VFVGTFGALG	IMTIISVVLG	R-TFHYVDEV	LPFRFGGIDL	PIDDIAAVCL	LVEFGV----	STLLDAVSD	260
At4g13590		CGLVFSLITF	VKGGPSSVLA	AVA--KSGFT	AAFSLIFFSE	LGDKTFFLAA	LLAMQYKEL	VLLGSMGALS	LMTILSVVIG	K-IFQSV---	PAQFQ-TTL	PIGEYAAIAL	LMFFGL----	KSIKDAWDL	
TMEM165		TPAAPVHTNK	EDPATQTNLG	FI---HAFV	AAISVIIVSE	LGDKTFFLAA	IMAMRYNRLT	VLAGAMLALG	LMTCLSVLFG	Y-ATTVIPRV	YTYVSTVLF	AFIGIRMLRE	GLKMSPDG-	QEELEEVQAE	
Gdt1p		TAAAAAATDA	ETPMESGSSS	HL---KSFL	MSVSMIGLSE	LGDKTFFLAA	LMAMRHRKVL	VFSAAATSLA	IMTILSGVVG	HSAAVFLSER	YTAFFAGILF	LVFGYKLIME	GLEMSKDAGV	EEEMAEVEEE	
Consensus		taaaa..c..	etp..stslg	.i.....f.	aa.s.i.vse	LGDKTFFLAA	l\$Amry.f.l	Vl.gam.alg	IMTil\$vv.g	..a.....ev	yta.f.g.lf	!fqi.....e	gl.ms.d.g.	..eel.#v..e	
At1g64150	261	EGKADEFQKE	AELAVS----	ELSG	NGAGIVAAAN	TIIS-----	--TFALVFVA	EWGDRSQST	IALAAASSPL	GVIAGALAGH	GAATLLAVLG	GSLGNFLSE	KAIAYVGGVL	FLVFAAVTVA	390
At4g13590		PPVEAKNGEE	TGIELG----	EYSE	AEELVKEKAS	KKLTNPLEIL	WKSFSLVFFA	EWGDRSQST	VALGAAQSPL	GVASGAIAGH	LVATVLAIMG	GAFLANYISE	KLVGYVGGAL	FLVFAAATFF	
TMEM165		LKKKDEFQR	TKLLNGPG--	DVET	GTSITVPQKK	WLHFI-SPIF	VQALTLTFLA	EWGDRSQST	IVLAAREDFY	GVAVGGTVGH	CLCTGLAVIG	GRMIAQISV	RTVTIIGGIV	FLAFASALF	
Gdt1p		IAIKDMNQDM	DDVEKGGDTA	YDKQLKNASI	GKKIVHRIRE	LASFMSFPVW	VQIFLMVFLG	ELGDRSQST	IAMATDSYV	YVIAGAVIGH	AICSGLAVVG	GKLLATRISI	RTITLASSLL	FFIFALMIYI	
Consensus		..kkde#q..	t.le.g....	.....#s.	g..ivv....	...f..spi.	vq.f.\$vfla	EWGDRSQst	!a\$aa.sdp.	gVaaGa..GH	..ctgLA!G	G.lla...iS.	rt!t...gg.l	Fl.FA....f	
At1g64150	391	EIVT													
At4g13590		GVF													
TMEM165		ISPDSGF													
Gdt1p		QAFTITQD													
Consensus		..ft...													

### Abbildung 3.11-2: Abgleich der Proteinsequenzen von PAM71, TMEM165 und Gdt1p

Die Sequenz von PAM71 (*At1g64150* und *At4g13590*) wurde mit verwandten Sequenzen von *Homo sapiens* (TMEM165) und *Saccharomyces cerevisiae* (Gdt1p) verglichen. Die mutmaßlichen Kalzium-Bindestellen sind schwarz umrandet.

Nach Marquardt, 2007, existieren zwei in Plastiden lokalisierte homologe PAM71 Proteine in *A. thaliana* und drei weitere, im Stammbaum nicht dargestellte, kernkodierte homologe PAM71 Proteine. Weitere homologe Proteine sind in Bakterien (*Thermosynechococcus elongatus*, *Mycobacterium vaccae*, *Geobacter sulfurreducens*, *Thermomonospora curvata*, *Synechocystis* sp., *Anabaena* sp.), Algen (*Clamydomonas reinhardtii*), Moosen (*Physcomitrella patens*), Gefäßpflanzen (*Oryza sativa*), Pilzen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*) aber auch in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* zu finden. Das Dendrogramm (Abb. 3.11-3) aus dem Abgleich zeigt die Verwandtschaft homologer PAM71 Proteine in evolutionsgeschichtlich näher verwandten Organismen.



**Abbildung 3.11-3:** Dendrogramm von PAM71

Darstellung der Verwandtschaft von PAM71 in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) mit homologen Proteinen in Reis (*O. sativa*), *Physcomitrella patens* (*P. patens*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), *Synechocystis* sp., *Anabaena* sp., *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) und *Homo sapiens* (*H. sapiens*).

## 4 Diskussion

### 4.1 Ursachen für den Wachstumsphänotyp der *pam71* Mutanten

Das Fehlen von PAM71 in *pam71* Mutanten hat drastische Folgen für den Zusammenbau von PSII und das Pflanzenwachstum (Abb. 3.1-1). Die Ausprägung des Phänotyps war ähnlich der der Mutanten *lpa1* (Peng et al., 2006a), *lpa2* (Ma et al., 2007), *lpa3* (Cai et al., 2010) und *pam68* (Armbruster et al., 2010), aber bei Weitem nicht so eklatant wie bei *hcf136* (Meurer et al., 1998) oder auch bei den albinotischen Mutanten *terc-1* (Strissel, 2011; Schneider et al., 2014; Kwon und Cho, 2008) und *alb3* (Sundberg et al., 1997). Auf Protein-Ebene war die Proteinmenge der PSII Untereinheiten D1, D2, CP43 und CP47 in *pam71* Mutanten reduziert, im Fall von PsbO, PsbP und PsbR sogar stark reduziert (Abb. 3.8-1 und 3.8-2). Ebenfalls reduziert war das Level der Untereinheit PsaA von PSI. Die Bildung von PSII Superkomplexen und PSII-Dimeren sowie PSII-Monomeren war verringert (Abb. 3.9-1), wohingegen die Neu-Synthese der PSII Untereinheiten D1, D2, CP43 und CP47 und der PSI Untereinheiten PsaA/PsaB nicht betroffen war (Abb. 3.4-1). Da weder die Transkription der Gene *psbA*, *psbB* und *psbC* (Abb. 3.2-1) von PSII noch die Initiierung der Translation der Gene *psbA* und *psbC* (Abb. 3.3-1) gestört war, kann davon ausgegangen werden, dass der Phänotyp von *pam71* auf posttranslational reduzierten Protein-Level und der fehlerhaften Assemblierung von PSII Superkomplexen beruht.

Um sicher zu gehen, dass der Phänotyp der *pam71* Mutanten auf dem Fehlen von PAM71 beruht und somit auf die T-DNA-Insertion im *At1g64150*-Gen zurück zu führen ist, wurden die Mutanten *pam71-1* und *pam71-2* mit dem *At1g64150*-Gen komplementiert (Marquardt, 2007). Zusätzlich lagen *pam71-1* und WT Pflanzen vor, die ein PAM71-GFP Fusionsprotein von einer ins Genom integrierten cDNA exprimierten. Dabei wurde ersichtlich (Foto: Abb. 3.10-1), dass alle komplementierten Linien einen großen und dunkelgrünen Phänotyp besaßen, auch wenn in *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> die Mutation nicht vollständig komplementiert werden konnte. Somit liegt der Schluss nahe, dass der Phänotyp der *pam71* Mutanten auf den Defekt im *At1g64150*-Gen zurückzuführen ist.

## 4.2 Die photosynthetische Leistung von PSII ist in *pam71* Mutanten betroffen

Der Phänotyp und die reduzierten PSII Untereinheiten von *pam71-1* gaben Anlass zur Durchführung von Spektralanalysen, um die Funktionalität und Effizienz des PSII und PSI zu überprüfen.

Das Prinzip, auf dem Chlorophyll a Fluoreszenz-Analysen basieren, ist relativ einfach. Die von Chlorophyll-Molekülen in Blättern absorbierte Lichtenergie kann drei verschiedene Prozesse durchlaufen. Erstens kann die aufgenommene Energie zum Antreiben der Photosynthese, der sogenannten Photochemie, dienen. Zweitens kann ein Überschuss an Energie in Form von Wärme abgegeben werden. Drittens kann ein Energieüberschuss auch in Form von Licht (Chlorophyll a Fluoreszenz) abgestrahlt werden. Diese drei Prozesse stehen in Konkurrenz zueinander. Dabei bedeutet eine erhöhte Effizienz des einen Vorgangs eine verringerte Ausbeute der anderen zwei Prozesse. Obwohl in jeder Pflanze die Gesamtenergie an Chlorophyll a Fluoreszenz sehr gering ist (nur 1-2% des gesamten absorbierten Lichts), sind die Spektralanalysen unkompliziert durchzuführen. Bei solchen Analysen wird die Fluoreszenzenergie quantifiziert, indem ein Blatt mit Licht definierter Wellenlängen bestrahlt und die abgestrahlte Fluoreszenzenergie gemessen wird. Dabei wird nur der Betrag des abgestrahlten Lichts (Fluoreszenz) längerer Wellenlängen gemessen (Review-Artikel: Maxwell und Johnson, 2000).

Die Mutanten *pam71-1* und *pam71-2* zeigten eine erhöhte Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) und eine reduzierte Ausbeute des PSII ( $F_v/F_m$ ) (Abb. 3.10-1 und 3.10-2). Die gewonnenen Daten gleichen den Daten der Spektralanalysen bei Mutanten, die in der PSII Assemblierung oder Stöchiometrie beeinflusst sind. Hierzu gehören die schon erwähnten Mutanten *lpa1* (Peng et al., 2006), *lpa2* (Ma et al., 2007), *lpa3* (Cai et al., 2010), *pam68* (Armbruster et al., 2010), *hcf136* (Meurer et al., 1998) und die albinotische Mutante *terc-1* (Strissel, 2011; Schneider et al., 2014; Kwon und Cho, 2008). Nachdem die Chlorophyll a Fluoreszenz-Kurve bei Belichtung mit aktinischem Licht angestiegen war, fällt die Chlorophyll a Fluoreszenz in der *pam71-1* und *pam71-2* Mutante unter die Grundfluoreszenz ab. Zu Beginn der Spektralanalysen wurden  $F_v/F_m$  und die effektive Ausbeute von PSII ( $\Phi_{II}$ ) ermittelt (Abb. 3.10-2). Zwei weitere kleine

Anstiege in der Chlorophyll a Fluoreszenz-Kurve während der Erholung der anfänglich höheren Chlorophyll a Fluoreszenz konnten im WT, nicht aber in den *pam71* Mutanten festgestellt werden. Diese beiden Anstiege resultieren aus der begrenzten Aufnahmekapazität von Elektronen des PSI und des Calvin-Zyklus im WT. Die Chlorophyll a Fluoreszenz-Kurve von *pam71-1* und *pam71-2* ist typisch für Mutanten, die ein reduziertes PSII/PSI Verhältnis besitzen (Meurer et al., 1998; Peng et al., 2006; Ma et al., 2007). Sie kann durch eine höhere Aktivität von PSI im Vergleich zu PSII erklärt werden (Armbruster et al., 2010). Der niedrige  $\Phi_{II}$  Wert von *pam71-1* und *pam71-2* ist auf den Defekt im PSII zurückzuführen und lässt auf einen eventuellen zusätzlichen Defekt entweder im PSI (Ihnatowicz et al., 2004) oder dem Cytochrom  $b_6/f$  Komplex schließen (Meurer et al., 1996).

Bei  $F_V/F_M$  Werten unter 0,5 ist die Mutation laut Meurer et al., 1996, direkt mit PSII assoziiert. Außerdem geben  $F_V/F_M$  Werte über 0,5 den Hinweis, dass ein Defizit in Proteinkomplexen der nachfolgenden Elektronentransportkette oder sogar im PSI besteht. Ergänzende P700 Absorptionsmessungen helfen zu entscheiden, ob ein alleiniger Defekt im PSII oder ein (zusätzlich) defektes PSI (Meurer et al., 1996) vorliegt. Da *pam71-1* und *pam71-2*  $F_V/F_M$  Werte von 0,68 bzw. 0,67 besaßen, musste ein möglicher Defekt im PSI mittels P700 Absorptionsmessungen untersucht werden. Meurer charakterisierte 1996 „high-chlorophyll-fluorescence“ (*hcf*) Mutanten mittels  $\Phi_I$ ,  $\Phi_{II}$  und  $F_V/F_M$  und ordnete sie mit Hilfe der gewonnenen Daten ihren Defekten im Photosynthese-Apparat zu. Da die P700 Absorptionsmessungen in dieser Arbeit nach dem Protokoll von Meurer et al., 1996, durchgeführt wurden, werden die *pam71* Mutanten dem Defekt im PSII zugeordnet.

Das P700 Signal der Absorptionsmessungen repräsentiert den Unterschied zwischen dem 875nm und dem 830nm Transmissionssignal. Eine positive Veränderung des P700 Signals reflektiert die Oxidation des P700 Reaktionszentrums. Die Oxidation findet mittels Belichtung mit dunkelrotem Licht statt, indem Elektronen zum Ferredoxin transportiert werden, was zur Reduktion von NADP und zur  $CO_2$ -Fixierung führen kann. Somit bedeuteten erhöhte Oxidationswerte eine verringerte Menge an Elektronen, die vom PSII weitergeleitet wurden. Daher lassen niedrige  $\Phi_I$  Werte eine höhere Oxidation von P700 erkennen und bedeuten somit einen Defekt des PSII, da weniger Elektronen vom PSII stammen.

Die *pam71* Mutanten zeigten einen klaren Chlorophyll a Fluoreszenz Phänotyp, der eine im PSII defekte Mutante beschreibt. Die  $F_v/F_m$  Werte der *pam71* Mutanten liegen über 0,5 und stammen von einer erhöhten Grundfluoreszenz (Abb. 3.10-1). Die Quantenausbeute von PSI ( $\Phi_I$ ) von *pam71-1* bzw. *pam71-2* liegt bei 0,65 und 0,8 und ist weder negativ noch sehr stark reduziert. Daher liegt sie im Wertebereich für Mutanten mit einem Defekt im PSII. Auch liegt die Quantenausbeute von PSI der *pam71* Mutanten genau um den Wert  $\Phi_I = 0,76$  der *psbo2xpsbo1* Pflanze, einer im PSII defekten Mutante.

Zusätzlich zu den *pam71* Mutanten wurden an den Pflanzenlinien, die PAM71-GFP und PAM71 stabil exprimieren (WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub>), Spektralanalysen durchgeführt, um die photosynthetische Funktionalität beider Genotypen zu untersuchen. WT<sub>35S:PAM71-GFP</sub> Pflanzen verhielten sich genau wie WT Pflanzen und wiesen die gleichen Chlorophyll a Fluoreszenz-Kurven und  $F_v/F_m$  Werte wie der WT auf. Auch  $\Phi_I$ , resultierend aus P700 Absorptionsmessungen, wich mit 0,89 nur geringfügig vom WT ( $\Phi_I = 0,88$ ) ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass der GFP-Tag in der Pflanze die Aktivität der Photosynthese kaum beeinflusst. Die Pflanzenlinien *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>, *pam71-1*<sub>35S:PAM71</sub> und *pam71-2*<sub>35S:PAM71</sub> zeigten wildtypische Chlorophyll a Fluoreszenz-Kurven, hatten aber leicht reduzierte  $F_v/F_m$  und  $\Phi_I$  Werte. Da Pflanzen dieser Linien minimal kleinere und hellere Phänotypen als der WT zeigen, stützen die Daten der Chlorophyll a Fluoreszenz die Vermutung, dass *pam71-1* und *pam71-2* nicht vollständig mit PAM71 bzw. PAM71-GFP komplementiert werden konnten. Diese unvollständige Komplementation könnte auf den 35S-Promotor zurückzuführen sein, der ursprünglich aus dem Cauliflower-Mosaik-Virus stammt. Normalerweise ist der 35S-Promotor in dikotylen Pflanzen voll funktionsfähig und führt zu einer hohen Rate der Genexpression. Eventuell ist dieser Promotor nicht für die Regulation von *PAM71* geeignet. Denkbar wäre auch, dass die cDNA von PAM71 bzw. PAM71-GFP zufällig an einer ungünstigen Stelle in das Genom eingebaut wurde und dort andere Schäden verursacht, die eine vollständige Komplementation nicht erkennen lassen.

### 4.3 PAM71 Proteinsequenz-Homologien

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Belege dafür, dass PAM71 ein integrales Membranprotein (Abb. 3.7-1A) mit sechs Membranspannen, einer mutmaßlichen Calmodulin-Bindestelle und zwei möglichen Kalzium-Bindestellen ist (Abb. 3.11-1). Es ist in der Thylakoidmembran lokalisiert (Abb. 3.5-1) und hat seinen C-Terminus auf der stromalen Seite (Abb. 3.7-1B). Chloroplasten von *pam71-1* Mutanten zeigen im Vergleich zum WT unter dem TEM die klassische Thylakoidmembran-Komposition und besitzen somit Grana-Stapel und Stromalamellen (Abb. 3.1-2). Die Analyse von Saccharose-Gradienten zeigten keine Co-Lokalisation zu PSII, PSI oder LHCII (Abb. 3.6-1). Allerdings lag PAM71-GFP (ca. 70kDa) in Fraktionen der Größen 70kDa bis 200kDa vor. Hierbei stellt sich die Frage, ob PAM71-GFP als Dimer mit einer Größe von ca. 140kDa vorliegen könnte oder eventuell an einen kleineren Komplex gebunden ist. Denkbar wäre, dass PAM71, möglicherweise zusammen mit anderen Proteinen, in der Thylakoidmembran eine Pore bildet oder als Transporter fungiert. Hinweise hierfür lieferten PAM71 homologe Proteine in anderen Organismen. Sie wurden über die Proteinsequenz von PAM71 ermittelt.

Die folgenden Organismen wurden auf homologe PAM71 Proteine überprüft und wiesen ebensolche auf: *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Oryza sativa* (2), *Arabidopsis thaliana* (2), *Physcomitrella patens* (2), *Chlamydomonas reinhardtii* (2), *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Synechocystis* sp., *Anabaena* sp., *Thermosynechococcus elongatus*, *Mycobacterium vaccae*, *Geobacter sulfurreducens* und *Thermomonospora curvata* (Abb. 3.11-2). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl homologer PAM71 Proteine an. In *A. thaliana* existieren zwei in Plastiden lokalisierte und drei weitere kernkodierte homologe PAM71 Proteine (Marquardt, 2007). Es fällt auf, dass PAM71 und seine homologen Proteine sowohl in evolutionsgeschichtlich älteren als auch jüngeren Organismen weit verbreitet sind. Dies lässt den Schluss zu, dass PAM71 früh in der phylogenetischen Entwicklung der Organismen entstanden ist und möglicherweise eine wichtige, grundlegende Funktion erfüllt, welche zusammen mit seiner Aminosäuresequenz im Laufe der Evolution konserviert geblieben ist.

Im Jahr 2013 wurden von Demaegd et al. zwei homologe Proteine von PAM71 veröffentlicht. Dabei handelt es sich um das „Transmembran Protein 165“ (TMEM165) im Menschen und um „Gcr1 dependent translation factor 1“ (Gdt1p) in Hefe.

*TMEM165* wurde bereits 2012 als Gen publiziert, das ein Protein mit unbekannter Funktion kodiert. Mutationen in diesem Gen führen zu angeborenen Störungen der Glycosilierung (CDG) beim Menschen. Protein-Glycosilierung ist ein komplexer Prozess, der nicht nur von der Aktivität verschiedener Enzyme und Transporter abhängt, sondern auch von einer feinen Balance zwischen dem vesikulären Golgi-Transport, dem Kompartiment-spezifischen pH und der Ionen Homöostase. CDG Typ II führt beim Menschen zu Kleinwüchsigkeit (Foulquier et al., 2012; Zeevaert et al., 2013).

Gdt1p in Hefe ist an der Toleranz gegenüber hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen beteiligt (Dudley et al., 2005; Demaegd et al., 2013).

Sowohl TMEM165 als auch Gdt1p sind im Golgi-Apparat lokalisiert (Rosnoblet et al., 2013; Demaegd et al., 2013); beide Proteine gehören der „Nicht-Charakterisierten Protein Familie 0016“ (UPF0016) an (Foulquier et al., 2012). Die Mitglieder der UPF0016 sind gut konserviert und werden in vielen Organismen gefunden, z.B. in 919 verschiedenen Bakterien und 409 Eukaryoten. Die meisten von ihnen tragen zwei Kopien einer hydrophoben Region, die die hoch konservierte interne Kalzium-Bindestelle (ExGD(KR)(TS)) enthält. Diese zwei homologen Regionen könnten das Ergebnis einer in der Vergangenheit stattgefundenen Gen-Duplikation sein. Sie besitzen laut bioinformatischer Voraussage drei Membranspannen und umschließen einen zentralen hydrophilen „Loop“, der gewöhnlich reich an sauren Aminosäure-Resten ist (Demaegd et al., 2013). Auf Grund der Anzahl der Transmembrandomänen sind die zwei Wiederholungen in einer parallelen oder antiparallelen Topologie angeordnet. Obwohl Monomere für den Transport ausreichen würden, werden bei sekundären Transportern oftmals Dimere oder Trimere beobachtet. Die Bildung solcher Oligomere könnte bei der Interaktion mit anderen Proteinen helfen, oder die Kooperation mit Untereinheiten ermöglichen. Auch die Erhöhung der Stabilität könnte eine Rolle spielen (Review-Artikel: Vinothkumar und Henderson, 2010). Interessanterweise kann der Wachstumsdefekt, der in Hefen durch die Abwesenheit von Gdt1p entsteht, durch die Expression von einer verkürzten Version von *TMEM165* teilweise aufgehoben werden.



Dies lässt vermuten, dass die Funktion dieser Proteine konserviert wurde. In menschlichen Zellen wurde gezeigt, dass TMEM165 in  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-Homöostase involviert ist. „Patch-clamp“ Analysen mit humanen Zellen deuten darauf hin, dass die Expression von *TMEM165* mit dem Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  verbunden ist. Auf diesen Ergebnissen basierend wurde vorgeschlagen, dass TMEM165 und Gdt1p zu einer besonderen Gruppe von im Golgi-Apparat lokalisierten  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  Antiportern gehören. Die Modifikation von  $\text{Ca}^{2+}$  und pH Balance könnte die Glycosilierungsdefekte in *TMEM165*-defekten Patienten erklären (Demaegd et al., 2013). Unterstützt wird diese These von neuesten Forschungsergebnissen an Mäusen, deren Resultate darauf hin deuten, dass TMEM165 tatsächlich eine Rolle im Milchdrüsengewebe als  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter des Golgi-Apparats spielt (Reinhardt et al., 2014).

Bezugnehmend auf die Daten von TMEM165 und Gdt1p als Mitglieder der UPF0016 ist es von großem Interesse, dass eine vergleichende Proteinsequenzanalyse für PAM71 die beiden Kalzium-Bindestellen bestätigt. Sie befinden sich in der ersten Membranspanne (ELGDKT) und zwischen der vierten und fünften Membranspanne (EWGDKS) (Abb. 3.11-1). Bezugnehmend auf die sechs vorausgesagten Transmembrandomänen von PAM71 in Verbindung mit der Theorie von sekundären Transporten, die oftmals Oligomere bilden, und auf die Ergebnisse der Co-Lokalisationsstudie (Abb. 3.6-1), lassen die Vermutung zu, dass PAM71 als Dimer vorliegt. Die Homologie zu TMEM165 und Gdt1p legen den Schluss nahe, dass PAM71 eine Rolle beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport spielt.

Calmodulin ist ein kleines  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein. Seine Funktion ist das Umwandeln sekundärer Signale in zelluläre Antworten. Hierbei nutzt Calmodulin eine Vielzahl an Möglichkeiten. Pflanzliche Calmodulin-Proteine teilen viele strukturelle und funktionelle Merkmale mit ihren homologen Proteinen in Tieren und Hefen. Die Expression von multiplen Protein-Isoformen scheint jedoch höheren Pflanzen vorbehalten zu sein. Calmodulin bindet innerhalb der Zielproteine an kurze Signalpeptid-Sequenzen und löst dadurch strukturelle Veränderungen am Zielprotein aus. Dies führt zu einer veränderten Aktivität der Zellantwort auf Änderungen in intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Das Spektrum an Calmodulin bindenden Proteinen in Pflanzen überlappt sich teilweise mit dem Spektrum der Tiere. Eine wachsende Anzahl an Calmodulin regulierten Proteinen in Pflanzen scheint jedoch einzigartig zu sein (Review-Artikel: Zielinski, 1998). Die

mutmaßliche Calmodulin-Bindestelle in PAM71 verstärkt die Annahme, dass PAM71 ein Kalzium-Transporter sein könnte.

#### 4.4 Ist Kalziummangel die Ursache für den Phänotyp von *pam71* Mutanten?

Die Oxidation des Wassers erfolgt durch den Wasserspaltungskomplex des PSII. Das Wasser wird in Protonen, Elektronen und molekularen Sauerstoff gespalten, während der Wasserspaltungskomplex fünf Zwischenstadien des sogenannten Kok-Zyklus durchläuft (Kok et al., 1970). Bei jedem Schritt des katalytischen Zyklus oxidiert P680 einen redox-aktiven Tyrosin-Rest ( $Y_Z$ ), der wiederum den Wasserspaltungskomplex des PSII oxidiert. Es werden vier aufeinander folgende Schritte der Photo-Oxidation benötigt, um den gesamten Zyklus zu durchlaufen. Dabei durchschreitet der Redox-Status des Wasserspaltungskomplexes von PSII fünf Anregungszustände ( $S_i$ , wobei  $i=0-4$ ). Der Grundzustand ist  $S_0$ ; vier sequenzielle Oxidationsschritte verwandeln den Wasserspaltungskomplex von PSII in den  $S_4$  Zustand. Eine O-O Brücke stellt den  $S_4$  Zustand dar, woraufhin der Wasserspaltungskomplex des PSII wieder in die Ausgangslage, den  $S_0$  Zustand, zurückspringt. Jeder der Oxidationsschritte, außer  $S_1 \rightarrow S_2$ , beinhaltet das Entlassen eines Protons in das Lumen. Folglich ist der effiziente Transfer eines Protons vom Wasserspaltungskomplex des PSII in das Lumen kritisch für den Redox-Ausgleich während der aufeinander folgenden Oxidationsschritte im Kok-Zyklus (Zusammenfassung: Pal et al., 2013). Die Frage, welche Rolle  $Ca^{2+}$  im Wasserspaltungskomplex von PSII spielt, beschäftigt Forscher schon seit den 1980er Jahren (Ghanotakis et al., 1984a, 1984c; Ono und Inoue, 1988). Im Jahr 1984 fanden Ghanotakis und Mitarbeiter heraus, dass stark salzbehandelte, isolierte PSII Superkomplexe 80% weniger Sauerstoff produzieren können. Ergänzt man die salzbehandelten, isolierten PSII Superkomplexe mit  $Ca^{2+}$ , kann effektiv die Sauerstoffproduktion wieder hergestellt werden. Erst 1998 konnte von Latimer et al. gezeigt werden, dass belichtete PSII Superkomplexe, mit vermindertem  $Ca^{2+}$ -Gehalt, zwar in den  $S_2$  Zustand gelangen können, dann aber auf Grund des schon oxidierten und deprotonierten  $Y_Z$ , das nun ein neutrales  $Y_Z$  darstellt, in diesem Zustand verbleiben. Wird  $Ca^{2+}$  durch  $Sr^{2+}$  ersetzt, kann belichtetes PSII eine stabile Leistung von 50% erreichen (Ghanotakis et al., 1984a; Ono und Inoue, 1988; Yocum, 2008). Forscher

haben in den letzten Jahren intensiv an der Struktur des  $\text{Mn}_4\text{-Ca-Oxo-Klusters}$  und an der Fragestellung gearbeitet, wie PSII beeinflusst wird, wenn das  $\text{Ca}^{2+}$  nicht im  $\text{Mn}_4\text{-Ca-Oxo-Kluster}$  vorhanden ist (Siegbahn, 2014; Yocum, 2008; Latimer et al., 1998; Debus, 1992; Chatterjee et al., 2014; Yang et al., 2014). So zeigen neueste Studien, zum Beispiel Yang et al., 2014 dass, wenn  $\text{Ca}^{2+}$  fehlt, mehrere Faktoren für den Block im  $\text{S}_2$  Zustand verantwortlich sind.

Geht man davon aus, dass PAM71 einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter mit zwei Kalzium-Bindestellen darstellt, der in der Thylakoidmembran lokalisiert ist, ist es denkbar, dass das im Wasserspaltungskomplex des PSII benötigte  $\text{Ca}^{2+}$  auf diesem Weg ins Lumen gelangen kann. Anschließend kann es in den Wasserspaltungskomplex von PSII eingebaut werden und stellt zusammen mit dem  $\text{Mn}_4\text{-Ca-Oxo-Kluster}$  das Reaktionszentrum der Wasserspaltung dar. Somit trägt es dort zur Spaltung des Wassers bei.

Unter der Annahme, dass  $\text{Ca}^{2+}$  im Lumen und daher im Wasserspaltungskomplex des PSII fehlt, ist das katalytische Zentrum des Wasserspaltungskomplexes nicht in der Lage, effektiv Wasser zu spalten. Als Folge davon ist die Photosynthese ineffektiver und ließe in Experimenten einen Defekt im PSII erkennen. Dies wäre eine mögliche Erklärung des PSII-Defekts in *pam71* Mutanten.

Wie spiegelt sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel im Phänotyp der *pam71* Mutanten wider? Sollte die schlechte Ausbeute des PSII in *pam71* Mutanten tatsächlich auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel zurückzuführen sein, kann man davon ausgehen, dass sich die photosynthetischen Proteinkomplexe den schlechteren Bedingungen anpassen. Hieraus könnte die verminderte Anzahl der Untereinheiten des PSII Reaktionszentrums sowie die geringe Proteinmenge der Untereinheiten des Wasserspaltungskomplexes von PSII resultieren. Da jedes PSII im Wasserspaltungskomplex ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion benötigt, ist es vorstellbar, dass nur so viele funktional intakte PSII vorhanden sind, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, möglicherweise auf anderen Transportwegen, in das Lumen gelangen. Eine derartig reduzierte Anzahl von PSII Komplexen würde in einem geringeren Chlorophyll-Gehalt resultieren. Dies zeigt sich in der helleren Färbung der *pam71* Mutanten im Vergleich zu WT Pflanzen. Dies dürfte durch die Anpassung von PSI verstärkt werden und würde die reduzierte Proteinmenge der Untereinheit PsaA des PSI in *pam71* Mutanten erklären. Durch die

insgesamt geringere Photosynthese-Leistung der *pam71* Mutanten im Vergleich zum WT kann nicht ausreichend Energie in Form von Kohlenhydraten gespeichert werden (Marquardt, 2007), wodurch sich der kleinere Habitus dieser Mutanten erklären ließe.

#### 4.5 Vergleich von *pam71* Mutanten mit Mutanten mit Defekt im Wasserspaltungskomplex des PSII

Die dramatischen Auswirkungen des Fehlens von  $\text{Ca}^{2+}$  im  $\text{Mn}_4\text{-Ca-Oxo}$ -Kluster wirft die Frage auf, welche Folgen ein Manganmangel im  $\text{Mn}_4\text{-Ca-Oxo}$ -Kluster hervorruft und ob diese Folgen den Auswirkungen des Kalziummangels ähnlich sind. Mehr als 80% des Mangans im Chloroplasten ist mit PSII assoziiert (Anderson et al., 1964). Manganmangel führt zu einer rapiden Reduktion der Sauerstoffproduktion (Anderson und Pylotis, 1969; Nabel et al., 1984; Chatterjee et al., 1994) und zu ausgeprägten Veränderungen in der Chlorophyll a Fluoreszenz-Kinetik (Anderson und Thorne, 1968; Kriedemann et al., 1985). Andauernder Manganmangel führt zu charakteristischen Blatt-Symptomen, wie intravenöser Chlorose und der anschließenden Entwicklung von nekrotischen Stellen. Diese nekrotischen Stellen stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Disorganisation der Thylakoidmembranen und dem Verlust des PSII-Reaktionszentrums (Simpson und Robinson, 1984; Papadakis et al., 2007). Krieger et al. erforschten 1998 die Photoinhibition der PSII Aktivität und den Verlust des D1 Proteins an PSII reichen Thylakoidmembranfragmenten, in denen der Wasserspaltungskomplex des PSII durch einen Mangel entweder an Kalzium oder Chlorid oder durch das Entfernen von Mangan gehemmt war. In den mangandefizienten PSII korrelierte die Aktivität und der Verlust an D1, während in den PSII mit geringer Anzahl an Kalzium- oder Chlorid-Ionen der Verlust an D1 nur geringfügig war. Interessanterweise zeigt die Manganmangel-Gersten-Mutante *Antonia* reduzierte  $F_V/F_M$  Werte, die aber mit Mangan-Düngung wieder angehoben werden konnten. Solange  $\text{Mn}^{2+}$  Mutanten einen  $F_V/F_M$  Wert über 0,5 aufweisen, sind sie frei von Blatt-Symptomen, die sonst einen  $\text{Mn}^{2+}$ -Mangel anzeigen. Chlorophyll a Fluoreszenz-Messungen von *Antonia* zeigen die gleiche Kurve wie *pam71* Mutanten und Mutanten, die im PSII defekt sind (Husted et al., 2009).

Jedoch zeigten Mutanten des Wasserspaltungskomplexes von PSII, *psbo-1* (Liu et al., 2009b), *psbp* (Ifuku et al., 2005), *psbq* (Yi et al., 2006) und *psbr* (Liu et al., 2009a) ähnliche Proteinverteilungen wie die Proteinverteilung in der *pam71-1* Mutante. Die Untereinheiten von PSII, D1, D2, CP43 und CP47 waren nur in der *psbo-1* und *psbp* Mutante reduziert. In der *psbq* Mutante war diese Proteinverteilung unter Schwachlicht zu beobachten. Die *psbr* Mutante wies reduzierte D2 Level auf. Während PsbP für die Regulation und Stabilität von PSII verantwortlich zu sein scheint, übernimmt diese Aufgabe PsbQ unter Schwachlicht-Bedingungen. PsbR scheint bei der Assemblierung von PsbP und PsbQ eine Rolle zu spielen. In jeder der Mutanten sind die Untereinheiten des Wasserspaltungskomplexes reduziert. Die Mutante *psbo-1* sieht *pam71* Mutanten vom Phänotyp sehr ähnlich. Die Parallelen der Proteinverteilung und des Wachstumsphänotyps von *psbo-1* unter Berücksichtigung des eventuellen Kalziummangels in *pam71* Mutanten bestärken die Vermutung, dass PAM71 in engem Zusammenhang mit dem Wasserspaltungskomplex des PSII steht.

#### **4.6 Ist ein Kalzium-Überschuss für den Phänotyp von *pam71* Mutanten verantwortlich?**

Der C-Terminus von PAM71 ist nachweislich (Abb. 3.7-1B) zur stromalen Seite der Thylakoidmembran orientiert. Der C-Terminus von TMEM165 ist im Gegensatz dazu zur lumenalen Seite des Golgi-Apparats ausgerichtet (Demaegd et al., 2013). Dadurch befindet sich der kalziumaktive „Loop“ von TMEM165 im Zytosol. Geht man davon aus, dass PAM71 und TMEM165 dieselbe Struktur aufweisen, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass sich in PAM71 der kalziumaktive „Loop“ im Lumen der Thylakoidmembran befindet. Sollte dies der Fall sein, könnte PAM71 Kalzium aus dem Lumen exportieren anstatt aus dem Stroma zu importieren. Dies hätte zur Folge, dass im Lumen ein Kalzium-Überschuss existiert. Kalzium ist toxisch für die Zellen: Bei hohen Kalzium-Konzentrationen kann es zusammen mit Phosphor ein unlösliches Salz, Kalziumphosphat, bilden. Kalziumphosphat steht in Wechselwirkung mit dem Nukleinsäure-Metabolismus (Review-Artikel: Nomura und Shiina, 2014) und könnte weitere wichtige Prozesse in der Pflanzenzelle stören. Auch wenn in der Literatur sehr viel mehr Informationen über Kalziummangel als über Kalzium-Überschuss in der Zelle zu finden ist, ist es noch zu untersuchen, ob der kleine Wachstumsphänotyp der *pam71*

Mutanten eventuell auf einen Kalzium-Überschuss im Lumen der Thylakoidmembran zurückzuführen ist.

## 4.7 Ausblick

Die Frage nach der Funktion von PAM71 bleibt trotz der vorliegenden Arbeit offen. Zusammengefasst ist PAM71 ein in der Thylakoidmembran lokalisiertes Protein mit vermutlich sechs Membranspannen, einer mutmaßlichen Calmodulin-Bindestelle und zwei möglichen Kalzium-Bindestellen. Vergleiche mit anderen PSII Mutanten weisen auf einen Defekt im PSII hin. Vor allem die Chlorophyll a Fluoreszenz-Messungen, die Reduktion der Untereinheiten des PSII und des Wasserspaltungskomplexes sowie das Fehlen der PSII Superkomplexe unterstützen diese Vermutung. Die Funktion von homologen Proteinen als Kalzium-Transporter deuten an, dass PAM71 am Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt sein könnte.

Bisher führten  $\text{Ca}^{2+}$ -Import-Versuche sowie Versuche zur Ermittlung von Interaktionspartnern und die Überexpression von PAM71 zu keinem plausiblen Ergebnis. Um die Funktion von PAM71 in Zukunft erforschen zu können, werden folgende Versuche vorgeschlagen: Mittels Nickel-NTA Affinitätschromatographie könnte ein PAM71-HIS-Fusionsprotein aufgereinigt und mit Hilfe der Calmodulin-Bindestelle Interaktionspartner ermittelt werden. Ebenfalls sollten Co-Immunopräzipitationsversuche unter Zuhilfenahme des GFP-Tags der komplementierten Linien intensiviert werden.

Zur Überprüfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Blättern der *pam71* Mutanten oder in den Thylakoidmembranen sollten Massenspektrometrie-Messungen mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) durchgeführt werden. Dieses Experiment wäre auch hilfreich bei der Entscheidung, ob in *pam71* Mutanten ein Kalziummangel oder ein Kalzium-Überschuss besteht. Die Klärung dieser Frage ist ein weiterer wichtiger Schritt hinsichtlich der Funktion von PAM71.

Zur Aufklärung der Funktion von PAM71 könnten Studien an einzelligen Organismen wie zum Beispiel Cyanobakterien oder Grünalgen (*Synechocystis* sp. bzw.

*Chlamydomonas reinhardtii*) oder auch an Moosen wie zum Beispiel *Physcomitrella patens* beitragen. Hierzu sollte PAM71 in den entsprechenden Organismus eingebracht werden. Ein Mangel an Kalzium könnte in diesen Organismen mittels Mediananreicherung leicht ausgeglichen werden.

Des weiteren sollte die Sauerstoffproduktion in *pam71* Mutanten mittels Sauerstoffelektrode ermittelt werden. Laut Literatur müsste bei einem Fehlen von  $\text{Ca}^{2+}$  die Sauerstoffproduktion drastisch reduziert sein. Im Falle einer reduzierten Sauerstoffproduktion kann über  $\text{Sr}^{2+}$ -Substitutionsversuche nachgedacht werden (Ghanotakis et al., 1984a; Ono und Inoue, 1988; Yocum, 2008).

In Anbetracht der Tatsache, dass in der Thylakoidmembran erst drei Transporter erforscht sind, ist das Interesse groß, weitere davon zu finden. Sollte PAM71 ein Kalzium-Transporter in der Thylakoidmembran sein, wäre dies ein großer Fortschritt in der Erforschung von Transportwegen durch die Thylakoidmembran von *A. thaliana*.

## 5 Literaturverzeichnis

### A

- Allen, J.F.** (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1098**: 275-335.
- Allen, J.F., and Forsberg, J.** (2001). Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci* **6**: 317-326.
- Anderson, J.M., Boardman, N.K., and David, D.J.** (1964). Trace metal composition of fractions obtained by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* **17**: 685–689
- Anderson, J.M., Chow, W.S., and Park, Y.-I.** (1995). The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research* **46**: 129–139.
- Anderson, J.M. and Pyliotis, N.A.** (1969). Studies with manganese-deficient spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* **189**: 280–293.
- Anderson, J.M., and Thorne, S.W.** (1968). The fluorescence properties of manganese deficient spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **162**: 122–134.
- Andersson, B., and Andersson, J.M.** (1980). Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **593**: 427–440.
- Armbruster, U., Carrillo, L.R., Venema, K., Pavlovic, L., Schmidtman, E., Kornfeld, A., Jahns, P., Berry, J. a, Kramer, D.M., and Jonikas, M.C.** (2014). Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments. *Nat. Commun.* **5**: 5439.
- Armbruster, U., Zühlke, J., Rengstl, B., Kreller, R., Makarenko, E., Rühle, T., Schünemann, D., Jahns, P., Weisshaar, B., Nickelsen, J., and Leister, D.** (2010). The *Arabidopsis* thylakoid protein PAM68 is required for efficient D1 biogenesis and photosystem II assembly. *Plant Cell* **22**: 3439–60.

### B

- Baker, N.R.** (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 89–113.



- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., and Dimroth, P.** (2009). Essentials for ATP synthesis by  $F_1F_0$  ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 649–672.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., and Miyano, S.** (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**: 298–305.
- Batistič, O. and Kudla, J.** (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 128312–93.
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J.D.** (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* **433**: 892–895.
- Blunder, T., Hertle, A., and Leister, D.** (2012). An update on cyclic electron flow around photosystem I in plants. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* **23**: 56–63.
- Boekema, E.J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A.F., Barber, J., and Rögner, M.** (1995). Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 175–179.
- Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P., and Leister, D.** (2005). Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* **437**: 1179–1182.

## C

- Cai, W., Ma, J., Chi, W., Zou, M., Guo, J., Lu, C., and Zhang, L.** (2010). Cooperation of LPA3 and LPA2 is essential for photosystem II assembly in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **154**: 109–120.
- Campbell, N.A., Reece, J.B.** (2003). *Biologie*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Carraretto, L., Formentin, E., Teardo, E., Checchetto, V., Tomizioli, M., Morosinotto, T., Giacometti, G.M., Finazzi, G., and Szabó, I.** (2013). A thylakoid-located two-Pore  $K^+$  channel controls photosynthetic light utilization in plants. *Science*. **342**: 114–119.
- Chatterjee, C., Nautiyal, N., and Agarwala, S.C.** (1994). Influence of changes in manganese and magnesium supply on some aspects of wheat physiology. *Soil Sci. Plant Nutr.* **40**: 191–197.
- Chatterjee, R., Milikisiyants, S., Coates, C.S., Koua, F.H.M., Shen, J.-R., and Lakshmi, K. V.** (2014). The structure and activation of substrate water molecules in  $Sr^{2+}$ -substituted photosystem II. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**: 20834–20843.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10881–10890.

## D

- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., and Leister, D.** (2008). A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* **132**: 273–285.
- Daum, B., Nicastro, D., Austin II, J., McIntosh, J.R., and Kühlbrandt, W.** (2010). Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *Plant Cell* **22**: 1299–1312.
- Debus, R.J.** (1992). The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1102**: 269–352.
- Demaegd, D., Foulquier, F., Colinet, A.-S., Gremillon, L., Legrand, D., Mariot, P., Peiter, E., Van Schaftingen, E., Matthijs, G., and Morsomme, P.** (2013). Newly characterized golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 6859–6864.
- Depege, N., Bellafiore, S., and Rochaix, J.D.** (2003). Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* **299**: 1572-1575.
- Dietzel, L., Bräutigam, K., and Pfannschmidt, T.** (2008). Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS J* **275**: 1080-1088.
- Dudley, A.M., Janse, D.M., Tanay, A., Shamir, R., and Church, G.M.** (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol. Syst. Biol.* **1744-4292**: 1–11.

## E

- Eberhard, S., Finazzi, G., and Wollman, F.A.** (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annu Rev Genet* **42**: 463-515.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., and von Heijne, G.** (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* **8**: 978–984.

## F

- Ferro, M., Brugière, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C., and Rolland, N.** (2010). AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **9**: 1063–1084.
- Fey, V., Wagner, R., Bräutigam, K., und Pfannschmidt, T.** (2005). Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *J Exp Bot* **56**: 1491-1498.
- Finazzi, G., Petroutsos, D., Tomizioli, M., Flori, S., Sautron, E., Villanova, V., Rolland, N., and Seigneurin-Berny, D.** (2014). Ions channels/transporters and chloroplast regulation. *Cell Calcium*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.002>
- Finazzi, G. and Rappaport, F.** (1998). In vivo characterization of the electrochemical proton gradient generated in darkness in green algae and its kinetic effects on Cytochrome  $b_6/f$  turnover. *Biochemistry* **2960**: 9999–10005.
- Fleischmann, M.M., Ravanel, S., Delosme, R., Olive, J., Zito, F., Wollman, F.A., and Rochaix, J.D.** (1999). Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition. *J Biol Chem* **274**: 30987-30994.
- Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., Bammens, R., Morelle, W., Rosnoblet, C., Legrand, D., Demaegd, D., Buist, N., Cheillan, D., Guffon, N., Morsomme, P., Annaert, W., Freeze, H.H., van Schaftingen, E., Vikkula, M., and Matthijs, G.** (2012). TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* **91**: 15–26.
- Fujita, Y.** (1997). A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: accomplishments and problems for future studies. *Photosynthesis Research* **53**: 83-93.

## G

- Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T., and Yocum, C.F.** (1984a). Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations. *FEBS Lett.* **167**: 127–130.
- Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T., and Yocum, C.F.** (1984b). Structural and catalytic properties of the Oxygen-Evolving Complex: correlation of polypeptide and manganese release with the behavior of  $Z^+$  in chloroplasts and a highly resolved preparation of the PSII complex. *Biochem. Biophys. Acta* **765**: 388–398.

## H

- Haldrup, A., Jensen, P.E., Lunde, C., and Scheller, H.V.** (2001). Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci* **6**: 301-305.
- Hertle, A.P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U., and Leister, D.** (2013). PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Mol. Cell* **49**: 511–23.
- Hoganson, C.W. and Babcock, G.T.** (1997). A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science*. **26**: 1953–1956.
- Höglund, A., Dönnies, P., Blum, T., Adolph, H.-W., and Kohlbacher, O.** (2006). MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics* **22**: 1158–1165.
- Hurt, E. and Hauska, G.** (1981). A Cytochrome f / b<sub>6</sub> Complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem* **117**: 591–599.
- Husted, S., Laursen, K.H., Hebborn, C. A., Schmidt, S.B., Pedas, P., Haldrup, A., and Jensen, P.E.** (2009). Manganese deficiency leads to genotype-specific changes in fluorescence induction kinetics and state transitions. *Plant Physiol.* **150**: 825–833.

## I

- Ifuku, K., Yamamoto, Y., Ono, T., Ishihara, S., and Sato, F.** (2005). PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiol.* **139**: 1175–1184.
- Ihnatowicz, A., Pesaresi, P., Varotto, C., Richly, E., Schneider, A., Jahns, P., Salamini, F., and Leister, D.** (2004). Mutants for photosystem I subunit D of *Arabidopsis thaliana*: effects on photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions. *Plant J.* **37**: 839–852.
- Iwata, S. and Barber, J.** (2004). Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 447–453.

## J

- Jensen, P.E., Haldrup, A., Zhang, S., and Scheller, H.V.** (2004). The PSI-O subunit of plant photosystem I is involved in balancing the excitation pressure between the two photosystems. *J Biol Chem* **279**: 24212-24217.
- Joliot, P. and Joliot, A.** (2006). Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 362–368.
- Junge, W., Haumann, M., Ahlbrink, R., Mulkidjanian, A., and Clausen, J.** (2002). Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**: 1407–1418.

## K

- Karnauchov, I., Herrmann, R.G., and Klösigen, R.B.** (1997). Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* **408**: 206–210.
- Keeling, P.J.** (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 583–607.
- Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstová, M., Tsabari, O., Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E., and Reich, Z.** (2011). Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *PANS* **108**: 20248–20253.
- Kok, B., Forbush, B., and McGloin, M.** (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *J.Photochem. Photobiol.* **11**: 457–475.
- Kriedemann P.E., Graham R.D., and Wiskich, J.T.** (1985). Photosynthetic dysfunction and in vivo changes in chlorophyll a fluorescence from manganese-deficient wheat leaves. *Aust J Agric Res* **36**: 157–169.
- Krieger A., Rutherford A.W., Vass I., and Hideg, E.** (1998). Relationship between activity, D1 loss, and Mn binding in photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry* **37**: 16262–16269.
- Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K.** (2010). Calcium signals: The lead currency of plant information processing. *Plant Cell* **22**: 541–563.
- Kunz, H.-H., Gierth, M., Herdean, A., Satoh-Cruz, M., Kramer, D.M., Spetea, C., and Schroeder, J.I.** (2014). Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 7480–7485.

- Kwon, K.-C. and Cho, M.H.** (2008). Deletion of the chloroplast-localized AtTerC gene product in *Arabidopsis thaliana* leads to loss of the thylakoid membrane and to seedling lethality. *Plant J.* **55**: 428–442.

## L

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-695.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G.** (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Latimer, M.J., DeRose, V.J., Yachandra, V.K., Sauer, K., and Klein, M.P.** (1998). Structural effects of calcium depletion on the manganese cluster of photosystem II : Determination by X-ray absorption spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **102**: 8257–8265.
- Liu, H., Frankel, L.K., and Bricker, T.M.** (2009a). Characterization and complementation of a *psbr* mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.* **489**: 34–40.
- Liu, H., Frankel, L.K., and Bricker, T.M.** (2009b). Functional complementation of the *Arabidopsis thaliana psbo1* mutant phenotype with an N-terminally His<sub>6</sub>-tagged PsbO-1 protein in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**: 1029–1038.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., and Whittier, R.F.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Journal* **8**: 457-463.
- Ljungberg, U., Åkerlung, H.-E., Larsson, C., and Andersson, B.** (1984). Identification of polypeptides associated with the 23 and 33 kDa proteins of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **767**: 145–152.
- Lunde, C., Jensen, P.E., Haldrup, A., Knoetzel, J., and Scheller, H.V.** (2000). The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* **408**: 613-615.

## M

- Ma, J., Peng, L., Guo, J., Lu, Q., Lu, C., and Zhang, L.** (2007). LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1980–1993.
- Marquardt, D.** (2007). Identifizierung und Charakterisierung von knock-out Mutanten der plastidären Proteine DAP1 und DAP2 in *Arabidopsis thaliana*.

- Maxwell, K. and Johnson, G.N.** (2000). Chlorophyll fluorescence — a practical guide. J. Exp. Bot. **51**: 659–668.
- Melis, A.** (1991). Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. Biochim Biophys Acta **1058**: 87–106.
- Meurer, J., Meierhoff, K., and Westhoff, P.** (1996). Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation. Planta **198**: 385–96.
- Meurer, J., Plücker, H., Kowallik, K. V., and Westhoff, P.** (1998). A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. EMBO J. **17**: 5286–5297.
- Morales, R., Kachalova, G., Vellieux, F., Charon, M.-H., and Frey, M.** (2000). Crystallographic studies of the interaction between the ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena*: looking for the elusive ferredoxin molecule. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **56**: 1408–1412.
- Moss, D.A. and Bendall, D.S.** (1984). Cyclic electron transport in chloroplasts. The Q-cycle and the site of action of antimycin. Biochim. Biophys. Acta **767**: 389–395.
- Müller, B. and Eichacker, L.A.** (1999). Assembly of the D1 precursor in monomeric photosystem II reaction center precomplexes precedes chlorophyll a – triggered accumulation of reaction center II in barley etioplasts. Plant Cell **11**: 2365–2377.
- Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T.** (2002). PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. Cell **110**: 361–371.

## N

- Nable R.O., Bar-Akiva A., and Loneragan J.F.** (1984). Functional manganese requirement and its use as a critical value for diagnosis of manganese deficiency in subterranean clover (*Triticum subterraneum* L. cv. Seaton Park). Ann Bot (Lond) **54**: 39–49.
- Nanba, O. and Satoh, K.** (1987). Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 109–112.
- Nelson, N. and Ben-Shem, A.** (2004). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **5**: 971–982.
- Nelson, N. and Yocum, C.F.** (2006). Structure and function of photosystems I and II. Annu. Rev. Plant Biol. **57**: 521–565.

- Nilsson, A., Stys, D., Drakenberg, T., Spangfort, M.D., Forsen, S., and Allen, J.F.** (1997). Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light harvesting complex II. *J Biol Chem* **272**: 18350-18357.
- Nomura, H. and Shiina, T.** (2014). Calcium signaling in plant endosymbiotic organelles: mechanism and role in physiology. *Mol. Plant* **7**: 1094–1104.
- Norris, J.R., Scheer, H., Druyan, M.E., and Katz, J.J.** (1974). An electron-nuclear double resonance (ENDOR) study of the special pair model for photo-reactive chlorophyll in photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**: 4897–4900.

## O

- Ono, T.-a. and Inoue, Y.** (1988). Discrete extraction of the Ca atom functional for O<sub>2</sub> evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment. *FEBS Lett.* **227**: 147–152.

## P

- Pal, R., Negre, C.F. A, Vogt, L., Pokhrel, R., Ertem, M.Z., Brudvig, G.W., and Batista, V.S.** (2013). S<sub>0</sub>-State model of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Biochemistry* **52**: 7703–7706.
- Papadakis, I.E., Bosabalidis, A.M., Soiropoulos, T.E., and Therios, I.N.** (2007). Leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of Mn-deficient orange plants. *Acta Physiol Plant* **29**: 297–301
- Peng, L., Chi, W., Guo, J., Zhu, S., Lu, Q., Lu, C., and Zhang, L.** (2006). LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**: 955–969.
- Pesaresi, P., Varotto, C., Meurer, È., Jahns, P., Salamini, F., and Leister, D.** (2001). Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant J.* **27**: 179–189.
- Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Kleine, T., Wagner, R., Strissel, H., Ihnatowicz, A., Bonardi, V., Scharfenberg, M., Schneider, A., Pfannschmidt, T., und Leister, D.** (2009). *Arabidopsis* STN7 Kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. *Plant Cell*, **21**: 2402-2423.



- Pfannschmidt, T., Bräutigam, K., Wagner, R., Dietzel, L., Schröter, Y., Steiner, S., and Nykytenko, A.** (2008). Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Annals of Botany* **103**: 599–607.
- Pfannschmidt, T., Schutze, K., Brost, M., and Oelmüller, R.** (2001). A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *J Biol Chem* **276**: 36125–36130.
- Porra, R.J.** (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth. Res.* **73**: 149–156.
- Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R., and Leister, D.** (2010). Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol* **8**(1): e1000288. doi:10.1371/journal.pbio.1000288.

## R

- Reinhardt, T. A., Lippolis, J.D., and Sacco, R.E.** (2014). The  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter TMEM165 expression, localization in the developing, lactating and involuting mammary gland parallels the secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SPCA1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**: 417–421.
- Rochaix, J.D.** (2007). Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation. *FEBS Lett* **581**: 2768–2775.
- Rochaix, J.D.** (2011). Reprint of: regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**: 878–886.
- Rochaix, J.-D.** (2014). Regulation and dynamics of the light-harvesting system. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**: 287–309.
- Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N., and Aro, E.-M.** (2005). Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem. J.* **388**: 159–168.
- Rosnoblet, C., Legrand, D., Demaegd, D., Hacine-Gherbi, H., de Bettignies, G., Bammens, R., Borrego, C., Duvet, S., Morsomme, P., Matthijs, G., and Foulquier, F.** (2013). Impact of disease-causing mutations on TMEM165 subcellular localization, a recently identified protein involved in CDG-II. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddt146

## S

- Saier, M.H., Yen, M.R., Noto, K., Tamang, D.G., and Elkan, C.** (2009). The transporter classification database: recent advances. *Nucleic Acids Res.* **37**: D274–D278.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2006). Separation of RNA according to size: electrophoresis of glyoxylated RNA through agarose gels. *CSH Protocols* **1**: 23-28
- Schneider, A., Steinberger, I., Strissel, H., Kunz, H.-H., Manavski, N., Meurer, J., Burkhard, G., Jarzombski, S., Schünemann, D., Geimer, S., Flügge, U.-I., and Leister, D.** (2014). The *Arabidopsis* Tellurite resistance C protein together with ALB3 is involved in photosystem II protein synthesis. *Plant J.* **78**: 344–356.
- Schwacke, R., Schneider, A., Graaff, E. Van Der, Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flu, U.-I., and Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON , a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* **131**: 16–26.
- Shimoni, E., Rav-hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V., and Reich, Z.** (2005). Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* **17**: 2580–2586.
- Siegbahn, P.E.M.** (2014). Water oxidation energy diagrams for photosystem II for different protonation states, and the effect of removing calcium. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**: 11893–11900.
- Simpson, D.J. and Robinson, S.P.** (1984). Freeze-fracture ultrastructure of thylakoid membranes in chloroplasts from manganese-deficient plants. *Plant Physiol* **74**: 735–741.
- Strissel, H.** (2011). TerC – an essential protein for the integration of CP43 into the thylakoid membrane and its assembly into photosystem II.
- Sundberg, E., Slagter, J.G., Fridborg, I., Cleary, S.P., Robinson, C., and Coupland, G.** (1997). ALBIN03, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* **9**: 717–730.

## T

- Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y., and Arnon, D.I.** (1963). Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**: 567–572.

- Takabayashi, A., Kishine, M., Asada, K., Endo, T., and Sato, F.** (2005). Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO<sub>2</sub> -concentration mechanism in C<sub>4</sub> photosynthesis. *PANS* **102**: 16898–16903.
- Tapken, W., Ravet, K., and Pilon, M.** (2012). Plastocyanin controls the stabilization of the thylakoid Cu-transporting P-type ATPase PAA2/HMA8 in response to low copper in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **287**: 18544–18550.
- Tikkanen, M., Piippo, M., Suorsa, M., Sirpiö, S., Mulo, P., Vainonen, J., Vener, A.V., Allahverdiyeva, Y., and Aro, E.M.** (2006). State transitions revisited-a buffering system for dynamic low light acclimation of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **62**: 779-793.

## U

- UniProt** (2014). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* **43**: 204–212.

## V

- Varotto, C., Pesaresi, P., Meurer, J., Oelmu, R., Steiner-Lange, S., Salamini, F., and Leister, D.** (2000). Disruption of the *Arabidopsis* photosystem I gene *psaE1* affects photosynthesis and impairs growth. *Plant J.* **22**: 115–124.
- Vener, A.V., van Kan, P.J., Rich, P.R., Ohad, I., and Andersson, B.** (1997). Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1585-1590.
- Vinothkumar, K.R. and Henderson, R.** (2010). Structures of membrane proteins. *Q. Rev. Biophys.* **43**: 65–158.
- Vrettos, J.S., Limburg, J., and Brudvig, G.W.** (2001). Mechanism of photosynthetic water oxidation : combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry. *Biochem. Biophys. Acta* **1503**: 229–245.

## W

- Walters, R.G.** (2005). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot* **56**: 435-447.
- Whatley, F.R., Tagawa, K., and Arnon, D.I.** (1963). Separation of the light and dark reactions in electron transfer during photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 266–270.

- Wijk, K.J. Van, Roobol-Boza, M., Kettunen, R., Andersson, B., and Aro, E.-M.** (1997). Synthesis and assembly of the D1 protein into photosystem II: processing of the C-Terminus and identification of the initial assembly partners and complexes during photosystem II repair. *Biochemistry* **36**: 6178–6186.
- Wollman, F.A.** (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J* **20**: 3623–3630.
- Wollman, F., Minai, L., and Nechushtai, R.** (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **1411**: 21–85.

## Y

- Yang, J., Hatakeyama, M., Ogata, K., Nakamura, S., and Li, C.** (2014). A theoretical study on the role of  $\text{Ca}^{2+}$  at the  $\text{S}_2$  State in photosystem II. *J. Phys. Chem.*: doi:10.1021/jp505889p.
- Yap, K.L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., and Ikura, M.** (2000). Calmodulin Target Database. *J. Struct. Funct. Genomics* **1**: 8–14.
- Yi, X., Hargett, S.R., Frankel, L.K., and Bricker, T.M.** (2006). The PsbQ protein is required in *Arabidopsis* for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy under low light conditions. *J. Biol. Chem.* **281**: 26260–26267.
- Yocum, C.** (2008). The calcium and chloride requirements of the  $\text{O}_2$  evolving complex. *Coord. Chem. Rev.* **252**: 296–305.

## Z

- Zeevaert, R., Zegher, de F., Sturiale, L., Garozzo, D., Smet, M., Moens, M., Matthijs, G., and Jaeken, J.** (2013). Bone dysplasia as a key feature in three patients with a novel congenital disorder of glycosylation ( CDG ) type II due to a deep intronic splice mutation in TMEM165. *JIMD Rep.*: doi:10.1007/8904\_2012\_172.
- Zhang, L., Paakkarinen, V., van Wijk, K.J., and Aro, E.-M.** (1999). Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II. *J. Biol. Chem.* **274**: 16062–16067.
- Zielinski, R.E.** (1998). Calmodulin and Calmodulin-binding proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 697–725.
- Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D., and Wollman, F.A.** (1999). The  $\text{Q}_o$  site of cytochrome  $b_6f$  complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J* **18**: 2961–2969.

## 7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dario Leister danke ich herzlich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in dieser Arbeitsgruppe anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Klingl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Anja Schneider danke ich für die Betreuung und die Freiheiten, die sie mir bei der Laborarbeit ließ.

Herrn Prof. Dr. Roberto Barbato von der Universität Turin, Alessandria, Italien, danke ich für die Antikörper gegen D1, D2, CP43 und CP47, ebenso Prof. Dr. Jürgen Soll von der LMU München für den Antikörper gegen Tic40.

Herrn PD Dr. Stefan Geimer von der Universität Bayreuth danke ich für die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Thylakoidmembran von WT, *pam71-1* und *pam71-1*<sub>35S:PAM71-GFP</sub>.

Herrn Prof. Dr. Jean-David Rochaix von der Université de Genève in der Schweiz bin ich zu Dank verpflichtet. Er stellte freundlicherweise die Abbildung 1.1.3-1: Elektronentransportkette der Photosynthese zur Verfügung.

Vielen Dank an Gabi Burkhard, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte. Sie stand mir jederzeit mit ihrem enormen Erfahrungsschatz zur Seite.

Dr. Arthur Guljamow danke ich für die wissenschaftlichen Ideen und angeregten fachlichen Diskussionen.

Ich danke der gesamten AG Leister für die letzten drei Jahre guter Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

München, den

---

Iris Steinberger